

**Maria Pedro Sucena Guarino**

**CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DO  
MONÓXIDO DE AZOTO E GLUTATIONO  
HEPÁTICOS NA SENSIBILIDADE PERIFÉRICA  
À INSULINA**

**Lisboa  
2007**

Dissertação de Doutoramento em Ciências da Vida,  
especialidade de Fisiologia, apresentada à Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

**FCT** Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Realizado com o apoio da Fundação para a Ciência e Tecnologia e do Fundo Social Europeu, no âmbito do III Quadro Comunitário de Apoio - BD/4916/2001.

À minha Mãe

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças á colaboração de várias pessoas e instituições, a quem desejo exprimir os meus sinceros agradecimentos.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, por me ter apoiado financeiramente.

À Faculdade de Ciências Médicas, por todas as facilidades concedidas para a realização do trabalho experimental.

À Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal pelo apoio financeiro.

À Professora Doutora Maria Paula Macedo, pela orientação do trabalho, pelo aconselhamento profissional e por todo o esforço dispendido para tornar este projecto uma realidade.

Ao Professor Doutor Mota Carmo, pela amizade, carinho e preocupação com que me honrou ao longo destes anos, e também pelo exemplo de competência, entusiasmo, força e perseverança.

Ao Professor Doutor Pedro F. Costa por ter sido um interlocutor atento, disponível e encorajador, pela amizade e pela sensatez com que sempre me aconselhou, tanto na Ciência como na Vida.

À Professora Doutora Graça Morais pela generosa colaboração, sem a qual uma parte significativa deste trabalho não teria sido possível.

Ao Professor Doutor António Rendas pela consideração e apoio a este projecto e também pela confiança demonstrada ao aceitar-me como assistente do Departamento de Fisiopatologia.

À Professora Doutora Ana Isabel Santos e Professor Doutor Pedro Marvão pela amizade afectuosa e pela ajuda inestimável na cuidada revisão do manuscrito.

Ao Professor Doutor Wayne Lutt, por me ter recebido no seu Laboratório e por me ter permitido partilhar ideias e usufruir do seu infindável conhecimento filosófico e científico.

Aos membros dos Departamentos de Fisiologia e Fisiopatologia da Faculdade de Ciência Médicas, pelo acolhimento e pela cooperação.

Ao Professor Doutor Ruy Pinto, Professora Doutora Cristina Santos e Professora Doutora Susana Marinho do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa por me terem possibilitado a aprendizagem do método enzimático de determinação do GSH nos seus laboratórios.

À Dr.<sup>a</sup> M.<sup>a</sup> de Lurdes Andrade e Dr.<sup>a</sup>. Adalgisa Tavares do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Ciências Médicas pelo apoio técnico na execução dos doseamentos de GSH.

A todos os membros do Laboratório da Professora Paula Macedo pelo carinho, amizade e ajuda incondicionais. Rita, Ricardo, Rogério, Ana e Nina, vocês tornaram os dias melhores.

A todos os meus amigos. Um agradecimento especial à Belina, à Joana, à Patrícia e à Diana pela alegria, pela cumplicidade e pela solidez de uma amizade de muitos anos.

À minha família. Ao meu irmão Miguel, aos meus Avós, à Mané, ao André e João, e, principalmente, aos meus pais por todo o carinho, compreensão, apoio, sacrifício, paciência e tudo o mais que vai ficar por dizer, porque as palavras nunca serão suficientes.

A todos, muito obrigada.

# Índice

Lista de abreviaturas	v
Lista de figuras e tabelas	viii
Publicações	x
Resumo	xi
Summary	xiii
Résumé	xv

## 1. Introdução

1.1. A homeostasia da glucose	1
1.1.1. Fontes e armazenamento da glucose	1
1.1.2. Captação e transportadores de glucose	2
1.1.3. Metabolismo da glucose	4
1.1.3.1. Metabolismo hepático da glucose	5
1.1.3.2. Metabolismo extra-hepático da glucose	7
1.2. Regulação do metabolismo da glucose	9
1.2.1. Regulação hormonal	10
1.2.1.1. Insulina: perspectiva histórica, síntese e acção	10
1.2.1.2. Outras hormonas	19
1.2.2. Regulação neuronal	20
1.2.3. Exercício físico	25
1.3. Fisiopatologia da resistência à insulina	27
1.3.1. Factores genéticos	27
1.3.2. Proteína cinase activada pelo AMP	29
1.3.3. <i>Stress</i> oxidativo	33
1.3.4. Gradiente hepato-portal	35
1.3.5. Hipótese vascular	36
1.3.6. Hipótese adipocêntrica	37
1.4. Metodologias para avaliação da sensibilidade à insulina <i>in vivo</i>	39
1.4.1. Metodologias de avaliação da sensibilidade à insulina realizadas em condições basais	39
1.4.2. Metodologias de avaliação da sensibilidade à insulina com intervenção dinâmica	40
1.4.2.1. Prova de tolerância à glucose oral (PTGO)	40

1.4.2.2. Clamp euglicémico hiperinsulinémico (HIEC)	41
1.4.2.3. Teste de tolerância à insulina (ITT)	42
1.4.2.4. Teste rápido de sensibilidade à insulina (RIST)	42
1.5. A hipótese da substância hepática sensibilizadora da insulina – HISS	43
1.5.1. A HISS é produzida no fígado	44
1.5.2. O papel do monóxido de azoto hepático	45
1.5.3. O efeito da HISS depende do estado prandial	48
1.5.4. Patologias em que existe comprometimento da acção da HISS	49
<b>2. Hipóteses e objectivos</b>	<b>52</b>
<b>3. Metodologias</b>	
3.1. Animais	55
3.2. Procedimento pré-cirúrgico	55
3.3. Procedimento cirúrgico	56
3.3.1. Traqueostomia	56
3.3.2. O circuito arterio-venoso	56
3.3.3. Cateterização da veia porta	59
3.4. Quantificação da glicémia	59
3.5. O RIST	61
3.6. Administração de fármacos	64
3.7. Quantificação do glutatióno hepático	65
3.8. Métodos estatísticos	66
3.9. Reagentes e soluções	66
<b>4. A interrupção da via de transdução de sinal ACh/NO/GMPc no fígado induz resistência à insulina</b>	
4.1. Introdução	68
4.2. Protocolos	69
4.3. Resultados	69
4.3.1. Efeito do inibidor do NOS hepático, L-NAME, na resistência à insulina ao longo do tempo	69
4.3.2. Efeito de dadores de NO na resistência à insulina que se observa após a inibição do NOS hepático	71



4.3.2.1. SIN-1 (3-hidrocloro de morfolinosidnonimina)	72
4.3.2.1. SNP (nitroprussiato de sódio)	75
4.3.3. Efeito do dador de NO, SIN-1, na resistência à insulina que se observa após inibição dos receptores muscarínicos	77
4.3.4. Efeito da ACh na resistência à insulina que se observa após inibição do NOS hepático	80
4.3.5. Envolvimento do guanilato ciclase na libertação da HISS	82
4.3.5.1. Azul de metileno	82
4.3.5.2. ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona)	84
4.4. Discussão	85

## **5. O glutathione hepático modula a acção da insulina**

5.1. Introdução	98
5.2. Protocolos	100
5.3. Resultados	100
5.3.1. Efeito da depleção do glutathione hepático na sensibilidade à insulina	100
5.3.2. Quantificação do glutathione hepático	104
5.4. Discussão	104

## **6. A co-administração de um dador de glutathione e um dador de monóxido de azoto na veia porta aumenta a sensibilidade à insulina em ratos Wistar em jejum**

6.1. Introdução	109
6.2. Protocolos	110
6.3. Resultados	111
6.3.1. Efeito da administração intraportal de GSH-E na sensibilidade à insulina em animais em jejum	111
6.3.2. Efeito da administração intraportal de SIN-1 na sensibilidade à insulina em animais em jejum	113
6.3.3. Efeito da administração combinada de SIN-1 e GSH-E na sensibilidade à insulina em animais em jejum	115
6.3.3.1. Estudos de dose e via de administração do SIN-1	115
6.3.3.2. Estudos de dose e via de administração do GSH-E	118
6.4. Discussão	123

<b>7. Efeito dos nitrosotíóis, GSNO e SNAP, na sensibilidade à insulina e sua relação com o estado prandial</b>	
7.1. Introdução	129
7.2. Protocolos	131
7.3. Resultados	131
7.3.1. Efeito do GSNO, SNAP e SIN-1 na sensibilidade à insulina, no estado de jejum	131
7.3.1.1. Administração de GSNO no estado de jejum	132
7.3.1.2. Administração de SNAP no estado de jejum	134
7.3.1.1. Administração de SIN-1 no estado de jejum	136
7.3.2. Efeito do GSNO e SNAP na sensibilidade à insulina, no estado pós-prandial	138
7.3.2.1. Administração de GSNO no estado pós-prandial	138
7.3.2.1. Administração de SNAP no estado pós-prandial	139
7.4. Discussão	141
<b>8. Discussão geral</b>	149
8.1. Considerações metodológicas	149
8.2. Desvio de um paradigma. A relevância da HISS na sensibilidade à insulina	153
8.3. A natureza química da HISS	158
8.4. A via da HISS como alvo terapêutico	160
<b>9. Bibliografia</b>	164

## Lista de abreviaturas

**$\gamma$ -GCS:** sintetase da  $\gamma$ -glutamilo-cisteína  
**AC:** adenilato ciclase  
**ACh:** acetilcolina  
**AGL:** ácidos gordos livres  
**AICAR:** 5-aminoimidazole-4-carboxamida ribosido  
**Akt:** proteína cinase B  
**AM:** azul de metileno  
**AMP:** 3',5'-monofosfato de adenosina  
**AMPc:** 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico  
**AMPK:** proteína cinase activada pelo AMP  
**APS:** proteína adaptadora com domínios de homologia com a plectrina e Src-2  
**ATP:** 5'-trifosfato de adenosina  
**BSO:** L-butionina sulfoximina  
**CaMKII:** cinase dependente da calmodulina II  
**CAP:** proteína adaptadora associada à Cbl  
**CCK:** colecistocinina  
**DAG:** diacilglicerol  
**eNOS:** sintase do monóxido de azoto endotelial  
**ERK 1/2:** cinases-regulados extracelularmente 1 e 2  
**G6-P:** glucose-6-fosfato  
**GC:** guanilato ciclase  
**GIP:** péptido inibitório gástrico  
**GK:** glucocinase  
**GLP-1:** *glucagon like peptide*  
**GLUT:** transportador de glucose  
**GMPC:** 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico  
**GOx:** glucose oxidase  
**Grb2:** proteína associada ao receptor para o factor de crescimento 2  
**GSH:** glutationo reduzido  
**GSH-E:** éster monoetilo de glutationo  
**GSNO:** S-nitrosoglutationo  
**GSSG:** glutationo oxidado  
**HbA1C:** hemoglobina glicosilada  
**HIEC:** clamp euglicémico hiperinsulinémico  
**HISS:** substância hepática sensibilizadora da insulina  
**HSuR:** rato submetido a uma dieta rica em sacarose  
**IGF-1:** *insulin-like growth factor*

**IKK:** cinase do I $\kappa$ B  
**IP<sub>3</sub>:** 1,4,5-trifosfato de inositol  
**ipv:** intraportal  
**IRS:** substratos do receptor da insulina  
**ITT:** teste de tolerância à insulina  
**iv:** intravenoso  
**JNK:** cinases N-terminal do c-jun  
**K<sub>ATP</sub>:** canais de potássio sensíveis ao ATP  
**L-NAME:** éster de N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil  
**L-NMMA:** N-monometil-L-arginina  
**MAPK:** proteína cinase activada por mitogénios  
**NADPH:** fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida reduzido  
**NF $\kappa$ B:** factor nuclear  $\kappa$ B  
**nNOS:** sintase do monóxido de azoto neuronal  
**NO:** monóxido de azoto  
**NOS:** sintase do monóxido de azoto  
**O<sub>2</sub><sup>-•</sup>:** radical anião superóxido  
**ODQ:** 1H- [1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalín-1-ona  
**ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito  
**PAM:** pressão arterial média  
**PDK:** cinase dependente dos fosfolípidos  
**PI<sub>3</sub>K:** cinase do fosfatidil inositol-3-fosfato  
**PKA:** proteína cinase dependente do AMPc  
**PKB:** proteína cinase B  
**PKC:** proteína cinase C  
**PLC:** fosfolipase C  
**PPAR- $\gamma$ :** *peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$*   
**PTGO:** prova de tolerância à glucose oral  
**RIST:** teste rápido de sensibilidade à insulina  
**RSNO:** S-nitrosotiol  
**SHP2:** tirosina fosfatase com domínios Src-2  
**SHR:** rato espontaneamente hipertenso  
**SIN-1:** 3-hidrocloreto de morfolinosidnonimina  
**SNAP:** S-nitrosoacetilpenicilamina  
**SNC:** sistema nervoso central  
**SNP:** nitroprussiato de sódio  
**SOD:** dismutase do superóxido  
**SOS:** proteína *son of sevenless*  
**Src-2:** domínio 2 de homologia com a oncoproteína Src

**TG:** triglicéridos

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrose tumoral  $\alpha$

**UDP-glucose:** glucose difosfato de uridina

## Lista de figuras e tabelas:

<b>Figura 1.1:</b> Regulação da secreção da insulina	13
<b>Figura 1.2:</b> Via de transdução de sinal do receptor da insulina	17
<b>Figura 1.3:</b> Modelo da homeostasia de nutrientes	24
<b>Figura 1.4:</b> Papel do AMPK na regulação da homeostasia da glucose	32
<b>Figura 1.5:</b> Esquema da hipótese da HISS	47
<b>Figura 3.1:</b> O circuito arterio-venoso	57
<b>Figura 3.2:</b> Esquematisação da sonda do analisador de glucose	60
<b>Figura 3.3:</b> Perfil típico de um RIST ao longo do tempo	63
<b>Figura 4.1:</b> Efeito da administração intraportal de L-NAME no RIST Index ao longo do tempo	70
<b>Figura 4.2:</b> Valores de RIST Index após administração intraportal de L-NAME, seguida de administração intraportal ou intravenosa de SIN-1	73
<b>Figura 4.3:</b> Perfis dinâmicos dos RISTs controlo, após L-NAME e após SIN-1 intraportal numa experiência padrão	74
<b>Figura 4.4:</b> Valores de RIST Index após administração intraportal de L-NAME, seguida de administração intraportal ou intravenosa de SNP	76
<b>Figura 4.5:</b> Valores de RIST Index após administração de atropina, seguida de administração intraportal de SIN-1	78
<b>Figura 4.6:</b> Perfis dinâmicos dos RISTs Index após atropina e após SIN-1 intraportal numa experiência padrão	79
<b>Figura 4.7:</b> Valores de RIST Index após administração intraportal de L-NAME, seguida de administração intraportal de ACh	81
<b>Figura 4.8:</b> Valores de RIST Index após administração de azul de metileno	83
<b>Figura 4.9:</b> Valores de RIST Index após administração de ODQ	85
<b>Figura 4.10:</b> Vias possíveis para a activação do GC pelo par NO/O <sub>2</sub> <sup>•</sup>	94
<b>Figura 4.11:</b> Mecanismo proposto para a secreção da HISS pelo fígado	96
<b>Figura 5.1:</b> Valores de RIST Index controlo e após L-NAME nos grupos placebo e BSO	101
<b>Figura 5.2:</b> Valores de RIST Index após L-NAME e após SIN-1 realizados nos grupo placebo e BSO	102
<b>Figura 5.3:</b> Acção total da insulina no grupo placebo e no grupo tratado com BSO, com as componentes dependente e independente da HISS discriminadas	103
<b>Figura 5.4:</b> Mecanismo proposto para a secreção da HISS pelo fígado	108
<b>Figura 6.1:</b> Valores de RIST Index após a administração intraportal de GSH-E	112
<b>Figura 6.2:</b> Valores de RIST Index após a administração intraportal de SIN-1	114

<b>Figura 6.3:</b> A) Valores de RIST Index no estado de jejum, após GSH-E intraportal e após SIN-1 intraportal. B) Valores de RIST Index no estado de jejum, após GSH-E intraportal e após SIN-1 intravenoso	117
<b>Figura 6.4:</b> RIST Index após SIN-1 em função da dose de GSH-E administrada por via sistêmica ou intraportal	121
<b>Figura 6.5:</b> RIST Index após co-administração de GSH-E e SIN-1 em função da concentração de GSH hepático	123
<b>Figura 6.6:</b> Mecanismo proposto para a secreção da HISS pelo fígado	128
<b>Figura 7.1:</b> Efeito da administração intraportal e intravenosa de GSNO no RIST Index em animais sujeitos a 24 horas de jejum	133
<b>Figura 7.2:</b> Efeito da administração intraportal e intravenosa de SNAP no RIST Index em animais sujeitos a 24 horas de jejum	135
<b>Figura 7.3:</b> Efeito da administração intraportal e intravenosa de SIN-1 no RIST Index em animais sujeitos a 24 horas de jejum	137
<b>Figura 7.4:</b> Efeito da administração intravenosa de GSNO no RIST Index em animais no estado pós-prandial	139
<b>Figura 7.5:</b> Efeito da administração intravenosa de SNAP no RIST Index em animais no estado pós-prandial	140
<b>Figura 7.6:</b> Mecanismo proposto para a secreção da HISS pelo fígado	148
<b>Figura 8.1:</b> A hipótese da HISS	159
<b>Figura 8.2:</b> Potenciais intervenções terapêuticas na via da HISS	162
<b>Tabela I:</b> Efeito da administração intraportal de diferentes doses de GSH-E nos níveis de GSH hepático de animais submetidos a jejum de 24 horas	113
<b>Tabela II:</b> Efeito da administração intraportal de diferentes doses de SIN-1 nos níveis de GSH hepático de animais submetidos a jejum de 24 horas	115
<b>Tabela III:</b> Valores dos RIST Index no estado de jejum e após co-administração intraportal de diferentes doses de GSH-E e SIN-1	119
<b>Tabela IV:</b> Valores de GSH hepático após administração de GSH-E intraportal, seguido de SIN-1 intraportal	122
<b>Tabela V:</b> Efeito da administração de doadores de NO, quimicamente distintos, na sensibilidade à insulina em função do modo de administração e do estado prandial	141

## PUBLICAÇÕES

Os resultados descritos nesta dissertação deram origem às seguintes publicações:

1. Guarino MP, Fernandes AB, Macedo MP. The role of S-nitrosothiols on insulin sensitivity in vivo. *Free Rad. Res. Biol. Med.* (submetido)
2. Guarino MP, Macedo MP (2006) Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *Br. J. Pharmacol.* 147 (8):959-965
3. Lautt WW, Macedo MP, d'Almeida MS, Legare DJ, Reid MAG, Guarino MP (2004) Pharmaceutical reversal of meal-induced insulin resistance. *Proc. West. Pharmacol.* 47:30-32.
4. Guarino MP, Correia NC, Lautt WW, Macedo MP (2004) Insulin sensitivity is mediated by the activation of the Ach/NO/cGMP pathway in the rat liver. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287(3):G527-G532
5. Guarino MP, Afonso RA, Raimundo N, Raposo JF, Macedo MP (2003) Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin sensitizing substance (HISS) action. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284:G588-G594
6. Correia NC, Guarino MP, Raposo JF and Macedo MP (2002) Hepatic guanylyl cyclase inhibition induced HISS-dependent insulin resistance. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 45: 57-58
7. Guarino MP, Correia NC, Raposo JF, Macedo MP (2001) Nitric oxide synthase inhibition decreases hepatic insulin sensitizing substance (HISS) output which is reversed by SIN-1 but not by nitroprusside. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 44:25-26



## RESUMO

A acção da insulina no músculo esquelético depende de um reflexo parassimpático hepático que conduz à libertação de uma substância hepática sensibilizadora da insulina, designada por HISS, responsável por cerca de 55% do efeito hipoglicemiante da insulina. A acção da HISS é finamente regulada pelo monóxido de azoto (NO) hepático e pelo estado prandial, aumentando no período pós-prandial imediato e diminuindo progressivamente com as horas de jejum. A secreção da HISS pode ser inibida cirúrgica ou farmacologicamente, quer por desnervação selectiva do plexo anterior hepático, quer por administração de atropina, quer por inibição do sintase do NO (NOS) hepático.

O objectivo geral do trabalho apresentado nesta dissertação foi a caracterização da via de transdução de sinal que conduz à libertação da HISS. O modelo utilizado neste estudo foi o rato Wistar. A sensibilidade à insulina foi avaliada através do teste rápido de sensibilidade à insulina (RIST).

A primeira hipótese de trabalho testada foi que a sequência de eventos que conduzem à secreção da HISS inicia-se com a activação do sistema parassimpático hepático seguida de activação do NOS hepático com subsequente produção de NO e activação do guanilato ciclase (GC). Observou-se que a administração de um dador de NO reverteu a resistência à insulina induzida, quer por inibição do NOS hepático, quer por antagonismo dos receptores muscarínicos com atropina. Em contraste, a resistência à insulina produzida por inibição do NOS hepático não foi revertida por administração intraportal de acetilcolina (ACh). Constatou-se que a inibição do GC hepático diminuiu a sensibilidade à insulina. Estes resultados sugerem que: a ACh libertada no fígado induz a síntese de NO hepático que conduz à libertação da HISS, que por sua vez é modulada pelo GC hepático.

A libertação da HISS em resposta à insulina é regulada pelo estado prandial. Uma vez que os níveis hepáticos de glutatióno (GSH) se encontram, tal como a HISS, diminuídos no

estado de jejum e aumentados após a ingestão de uma refeição, testou-se a hipótese de que o GSH hepático está envolvido na secreção da HISS. Observou-se que a depleção do GSH hepático induziu resistência à insulina, comparável à obtida após inibição do NOS hepático. Estes resultados suportam a hipótese de que o GSH hepático desempenha um papel crítico na acção periférica da insulina.

Considerando que, no estado de jejum, tanto os níveis de GSH hepático como os níveis de NO hepático são baixos, testou-se a hipótese de que a co-administração intraportal de um dador de GSH e de um dador de NO promove um aumento da sensibilidade à insulina no estado de jejum, devido ao restabelecimento do mecanismo da HISS. Observou-se que a administração sequencial de dadores de GSH e de NO no fígado provocou um aumento na sensibilidade à insulina, dependente da dose de dador de GSH administrada. Concluiu-se portanto que ambos, GSH e NO, são essenciais para que o mecanismo da HISS esteja completamente funcional.

O GSH e o NO reagem para formar um S-nitrosotiol, o S-nitrosoglutathione (GSNO). Os resultados supra-mencionados conduziram à formulação da hipótese de que a secreção/acção da HISS depende da formação de GSNO. Observou-se que a administração intravenosa de S-nitrosotióis (RSNOs) aumentou a sensibilidade à insulina, em animais submetidos a um período de jejum, ao contrário da administração intraportal destes fármacos, o que RSNOs têm uma acção periférica, mas não hepática, na sensibilidade à insulina.

Os resultados obtidos conduziram à reformulação da hipótese da HISS, sugerindo que a ingestão de uma refeição activa os nervos parassimpáticos hepáticos levando à libertação de ACh no fígado que, por sua vez activa o NOS. Simultaneamente, ocorre um aumento dos níveis de GSH hepático que reage com o NO hepático para formar um composto nitrosado, o GSNO. Este composto mimetiza a acção hipoglicemiante da HISS no músculo esquelético.

## SUMMARY

Insulin action at the skeletal muscle depends on a hepatic parasympathetic reflex that promotes the release of a hepatic insulin sensitizing substance (HISS) from the liver, which contributes 55% to total insulin action. HISS action is modulated by hepatic nitric oxide (NO) and also by the prandial status so as to, in the immediate postprandial state, HISS action is maximal, decreasing with the duration of fasting. HISS secretion may be inhibited by interruption of the hepatic parasympathetic reflex, achieved either by surgical denervation of the liver or by cholinergic blockade with atropine, or by prevention of hepatic NO release, using NO synthase (NOS) antagonists.

The main objective of this work was to characterize the signal transduction pathways that lead to HISS secretion by the liver. Wistar rats were used and insulin sensitivity was evaluated using the rapid insulin sensitivity test (RIST).

The first hypothesis tested was that the sequence of events that lead to HISS secretion starts with an increase in the hepatic parasympathetic tone, followed by the activation of hepatic NOS and subsequent triggering of guanylate cyclase (GC). We observed that insulin resistance produced either by muscarinic receptor antagonism with atropine or by hepatic NOS inhibition was reversed by the intraportal administration of an NO donor. In contrast, intraportal acetylcholine (ACh) did not restore insulin sensitivity after NOS inhibition. We also observed that GC inhibition lead to a decrease in insulin sensitivity. These results suggest that the release of ACh in the liver activates hepatic NO synthesis in order to allow HISS secretion, through a signaling pathway modulated by GC.

HISS release in response to insulin is controlled by the prandial status. The second hypothesis tested was that glutathione (GSH) is involved in HISS secretion since the hepatic levels of GSH are, like HISS action, decreased in the fasted state and increased after ingestion of a meal. We observed that hepatic GSH depletion led to insulin resistance of

the same magnitude of that observed after inhibition of hepatic NOS. These results support the hypothesis that hepatic GSH is crucial in peripheral insulin action.

Since, in the fasted state, both hepatic GSH and NO levels are low, we tested the hypothesis that intraportal co-administration of a GSH donor and an NO donor enhances insulin sensitivity in fasted Wistar rats, by restoring HISS secretion. We observed that GSH and NO increased insulin sensitivity in a GSH dose-dependent manner. We concluded that HISS secretion requires elevated levels of both GSH and NO in the liver.

GSH and NO react to form a S-nitrosothiol, S-nitrosoglutathione (GSNO). The last hypothesis tested in this work was that HISS secretion/ action depends on the formation of GSNO. We observed that intravenous administration of S-nitrosothiols (RSNOs) increased insulin sensitivity in animals fasted for 24 h, in contrast with the intraportal administration of the drug. This result suggests that RSNOs enhanced insulin sensitivity through a peripheral, and not hepatic, mechanism.

The results obtained led to a restructuring of the HISS hypothesis, suggesting that the ingestion of a meal triggers the hepatic parasympathetic nerves, leading to the release of Ach in the liver, which in turn activates NOS. Simultaneously, hepatic GSH levels increase and react with NO to form a nitrosated compound, GSNO. S-nitrosoglutathione mimics HISS hypoglycaemic action at the skeletal muscle.

## RÉSUMÉ

L'action de l'insuline sur le muscle squelettique dépend d'un réflexe parasympathique hépatique qui conduit à la libération d'une substance hépatique sensibilisatrice de l'insuline, désigné par HISS, responsable environ pour 55% de l'effet hypoglycémiant. La libération du HISS est contrôlée par le monoxyde d'azote (NO) et par l'état prandial, augmentant dans la période post prandial immédiate et diminuant graduellement avec le jeûne. La libération du HISS peut être inhibée après la dénervation du foie ou par l'inhibition des récepteurs muscariniques avec atropine ou par l'inhibition du synthase du NO hépatique.

Le principal objectif de ce travail a été d'établir les voies de transduction du signal qui permette la libération du HISS du foie. On a utilisé des rats Wistar et on a évalué la sensibilité à l'insuline avec le test rapide de sensibilité à l'insuline (RIST).

La première hypothèse de travail testée a été que la séquence d'événements qui conduit à la sécrétion de HISS, commence avec l'activation du système parasympathique suivi par l'activation du NOS hépatique et l'activation du guanylate cyclase (GC).

On a enregistré que l'administration d'un donneur de NO a fait renverser la résistance à l'insuline induite soit par l'inhibition du NOS hépatique soit par l'antagonisme des récepteurs muscariniques avec atropine.

Contrairement, l'insulinorésistance obtenue produite par l'inhibition du NOS hépatique n'a été pas renversée par l'administration intra portale d'acétylcholine (ACh). On a constaté que l'inhibition du GC hépatique a réduit la sensibilité à l'insuline. Donc, nous stipulons que l'ACh libérée par le foie, conduit à la synthèse de NO hépatique qui conduit à la libération du HISS sur le contrôle du GC hépatique.

La libération du HISS en réponse à l'insuline est contrôlée par l'état prandial. On a essayé l'hypothèse que le glutathion (GSH) hépatique règle la production de l'HISS par le foie, car il dépend aussi de l'état prandial, vu que les niveaux hépatiques de GSH sont baissés à jeûne et augmentés après un repas. On a observé que l'apaisement du GSH

hépatique a induit une insulino-résistance, semblable à celle l'observée après l'inhibition du NOS hépatique. Ces résultats, suggèrent que le GSH du foie assure un rôle essentiel dans l'action périphérique de l'insuline.

Considérant qu'en état de jeûne, aussi bien le GSH hépatique que le NO hépatique sont bas, on a testé l'hypothèse que la co-administration, dans la circulation portale, d'un donneur de NO et d'un donneur de GSH induit une augmentation de la sensibilité à l'insuline par le rétablissement du mécanisme du HISS. On a observé que l'administration séquentiel de GSH et NO a augmenté la sensibilité à l'insuline d'une façon selon la dose de GSH administrée. De cette façon, on a conclu que le GSH et NO sont essentiels pour le fonctionnement de la voie du HISS.

Le GSH et le NO réagissent pour former un S-nitrosothiol, le S-nitrosoglutathione (GSNO). Les résultats qu'on a décrits, suggèrent que la libération du HISS dépend de la formation de GSNO. On a observé que l'administration de S-nitrosothiols (RSNOs) dans la circulation veineuse, sur des animaux, a augmenté la sensibilité à l'insuline après une période de jeûne, au contraire de l'administration dans la circulation portale. Donc, on suggère que les RSNOs ont une action périphérique, et pas hépatique, dans la sensibilité à l'insuline.

Les résultats obtenus ont conduit à la reformulation de l'hypothèse de l'HISS. La prise de nourriture active les nerfs parasympathiques hépatiques qui libèrent ACh dans le foie et en suite active le NOS. Simultanément, les niveaux de GSH hépatique augmentent et le GSH réagit avec le NO pour former GSNO. Cette molécule reproduit l'action hypoglycémiant du HISS dans le muscle squelettique.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A HOMEOSTASIA DA GLUCOSE

A manutenção dos níveis plasmáticos de glucose dentro de um intervalo relativamente estreito é de uma importância vital para os mamíferos, particularmente para manter um fornecimento contínuo de glucose ao sistema nervoso central onde esta é o substrato energético por excelência. Os níveis plasmáticos de glucose dependem do balanço entre o seu aporte à circulação sanguínea e a sua captação pelos tecidos sendo que, em condição basais, o aporte iguala as necessidades promovendo a manutenção da euglicémia. A hipoglicémia prolongada pode conduzir a coma e, se não for corrigida, pode mesmo levar à morte. A hiperglicémia é também deletéria para os organismos vivos, conduzindo a desidratação por perda de substratos energéticos, água e electrólitos na urina e a lesões patológicas em vários órgãos e tecidos. A regulação do metabolismo energético nos humanos é um processo intrincado que envolve interacções complexas entre nutrientes exógenos, hormonas e neurotransmissores.

### 1.1.1 Fontes e armazenamento da glucose

A principal fonte exógena da glucose plasmática são os nutrientes obtidos via absorção intestinal. Após uma refeição rica em hidratos de carbono, os polissacáridos e dissacáridos são hidrolisados em glucose, galactose e frutose no lúmen intestinal. A glucose é co-transportada com sódio ( $\text{Na}^+$ ) por transportadores especializados existentes na bordadura em escova das células epiteliais do intestino delgado (Bihler *et al.*, 1987). A glucose atravessa depois a membrana basal da célula epitelial através de um processo de difusão facilitada (Bihler *et al.*, 1987). O sangue enriquecido em hidratos de carbono

drena para a veia porta, sendo o fígado um dos primeiros órgãos expostos a uma concentração elevada de açúcares.

O fígado é o órgão central no metabolismo dos hidratos de carbono regulando o equilíbrio entre o aporte e a demanda de nutrientes. Este órgão capta cerca de 30 % da glucose obtida a partir da dieta, sendo que parte da glucose é armazenada sob a forma de glicogénio que irá garantir a manutenção dos níveis plasmáticos de glucose durante períodos de jejum (Pickup, 2003). A capacidade máxima de armazenamento de glucose pelo fígado é de cerca de 75 g no humano (Pickup, 2003). Os restantes hidratos de carbono podem ser armazenados como glicogénio no músculo esquelético ou, de uma forma mais eficiente, sob a forma de triglicéridos (TG) no tecido adiposo. O armazenamento de energia sob a forma de glicogénio é relativamente ineficiente uma vez que o glicogénio é muito hidrofílico, levando à produção de apenas 1 a 2 calorias por grama de glicogénio hidratado em vez das esperadas 4 calorias por grama de glicogénio não hidratado (Pickup, 2003). Em contraste os TG são armazenados num meio não aquoso, gerando energia em valores muito próximos dos teóricos, que correspondem a 9.4 calorias por grama de triglicérido (Pickup, 2003). Esta elevada eficiência de armazenamento de energia promovida pela gordura é crucial para a existência humana, permitindo maior mobilidade e promovendo a sobrevivência em períodos de escassez de alimentos.

### **1.1.2 Captação e transportadores da glucose**

O padrão de captação de glucose pelos diferentes tecidos é determinado por vários factores, nomeadamente pela distribuição de diferentes isoformas de transportadores de glucose, pela capacidade dos tecidos de utilizarem substratos energéticos alternativos e pelo gradiente de glucose entre o citosol e o interstício.



O lúmen intestinal constitui, juntamente com o túbulo contornado proximal no rim, uma excepção ao transporte de glucose a favor do gradiente de concentração, uma vez que a absorção de glucose é feita por transporte dependente de  $\text{Na}^+$ , contra o gradiente de glucose. No entanto, a maior parte dos transportadores de glucose são proteínas membranares que funcionam como canais por onde a glucose passa por difusão facilitada. Estes transportadores de glucose (GLUTs) permitem a entrada da glucose para o interior das células, a favor do gradiente de concentração, num processo que não requer energia. Conhecem-se hoje em dia pelo menos treze isoformas de GLUTs (GLUT-1 a 12 e HMIT) (Wood *et al.*, 2003). O GLUT-1 foi o primeiro a ser caracterizado, encontra-se expresso em vários tecidos, particularmente no cérebro e nos eritrócitos, e é responsável pelo transporte basal de glucose. O transportador GLUT-2 tem especial relevância nas células  $\beta$  dos ilhéus de Langerhans, onde o seu elevado  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) permite que a entrada de glucose na célula  $\beta$  seja directamente proporcional aos níveis extracelulares de glucose, funcionando como um sensor de glucose plasmática (Shepherd *et al.*, 1999). O GLUT-2 é também o transportador predominante nos hepatócitos e no rim. O GLUT-3 tem elevada afinidade para a glucose, o que é consistente com a sua elevada expressão em tecidos onde a demanda de glucose é elevada, particularmente no cérebro. O GLUT-4 tem uma importância fulcral no transporte de glucose mediado pela insulina, sendo expresso em tecidos sensíveis à acção desta hormona como o músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo (Shepherd *et al.*, 1999). Ao contrário dos GLUTs já referidos, que são proteínas constitutivamente expressas na membrana celular, os GLUT-4 encontram-se armazenados em vesículas no citoplasma, sendo recrutados e translocados para a membrana mediante ligação da insulina ao seu receptor. O recrutamento das reservas intracelulares de GLUT-4 conduz a um aumento de 10 a 20 vezes na captação celular de glucose (Bryant *et al.*, 2002). Assim, a capacidade da insulina de estimular a captação de glucose

no músculo esquelético e tecido adiposo é directamente proporcional à quantidade de GLUT-4 expressa por estes tecidos.

O GLUT-5 e GLUT-11 são transportadores de frutose. Enquanto que o GLUT-5 é expresso na membrana apical dos enterócitos, testículos e rim, o GLUT-11 é expresso no coração, músculo esquelético, fígado, pulmão e cérebro. O GLUT-7, GLUT-9 e GLUT-12 ainda não foram caracterizados funcionalmente, sabendo-se apenas que a expressão do GLUT-9 é evidente no fígado e rim, enquanto que o GLUT-12 surge no coração, intestino, próstata e tecidos sensíveis à insulina (Rogers *et al.*, 2002). O GLUT-6, expresso no baço e leucócitos, tem localização intracelular mas a sua translocação para a membrana não é estimulada pela insulina, ao contrário do GLUT-8, expresso no cérebro, testículos e tecido adiposo (Wood *et al.*, 2003). O GLUT-10 é expresso em tecidos sensíveis à insulina e está associado a um *locus* de susceptibilidade para a diabetes *mellitus* tipo 2 no cromossoma 20 (Dawson *et al.*, 2001).

### **1.1.3 Metabolismo da glucose**

O fígado e o músculo esquelético são os principais órgãos reguladores do metabolismo glicídico em condições fisiológicas. Para além do fígado, também o rim é capaz de libertar glucose para utilização por outros tecidos, embora a sua contribuição seja diminuta. Enquanto que tanto o fígado como o rim podem sintetizar glucose *de novo* (gluconeogénese) a partir de substratos gluconeogénicos tais como o lactato, piruvato, glicerol e alguns aminoácidos, apenas o fígado produz significativamente glucose através da degradação de glicogénio (glicogenólise). Durante um jejum prolongado, a gluconeogénese renal aumenta substancialmente devido a alterações hormonais, podendo mesmo chegar a contribuir com 45 % da produção total de glucose (Owen *et al.*, 1969). Todas estas vias metabólicas são finamente reguladas pelo estado nutricional, factores humorais, sistema nervoso autónomo e pela actividade física.

### 1.1.3.1 Metabolismo hepático da glucose

A quantidade de glucose captada pelos hepatócitos depende directamente da concentração de glucose na veia porta e do gradiente de glucose através da membrana dos hepatócitos (Wals *et al.*, 1993). Após a transferência de glucose para os hepatócitos pelos GLUT-2, forma-se glucose-6-fosfato (G6-P) numa reacção catalisada pelo enzima glucocinase (Gould *et al.*, 1991). A G6-P é então oxidada para produzir 5'-trifosfato de adenosina (ATP) ou convertida em glucose difosfato de uridina (UDP-glucose), o precursor que doa um grupo glicosil à cadeia de glicogénio (Pickup, 2003). A glucose também activa o enzima sintase do glicogénio (Stalmans *et al.*, 1974) não sendo, no entanto, o principal estímulo para a síntese hepática de glicogénio (glicogénese), uma vez que se verificou que esta só ocorre na presença conjunta de glucose e de insulina (Plas *et al.*, 1982). O controlo do metabolismo hepático do glicogénio pela insulina parece envolver a regulação do sintase do glicogénio através da actividade de tirosina cinase do receptor da insulina (Radziuk, 1991).

Durante a transição do estado pós-prandial para o estado de jejum, os níveis de glucose plasmática são mantidos por um aumento progressivo da produção de glucose hepática, à medida que o aporte de nutrientes do intestino começa a diminuir. Após um período nocturno de jejum, cerca de 75 % da produção de glucose hepática provém da glicogenólise, sendo a restante derivada da síntese de novo de glucose (Wahren *et al.*, 1972). Ao fim deste período as reservas hepáticas de glicogénio diminuem rapidamente.

A degradação do glicogénio é primariamente mediada pelo enzima fosforilase do glicogénio que, por sua vez, é estimulado pela glucagina e catecolaminas. Estas hormonas estimulam o enzima adenilato ciclase, aumentando os níveis de 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e activando o proteína cinase dependente do AMPC (PKA), que inibe o sintase do glicogénio e activa o fosforilase do glicogénio por fosforilação, actuando no sentido da promoção da glicogenólise (Sutherland *et al.*, 1955).

As catecolaminas também conduzem a um aumento de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, o que contribui para a potenciação da glicogenólise hepática uma vez que o  $\text{Ca}^{2+}$  promove a fosforilação do sintase do glicogénio, e sua subsequente inativação, via cinase dependente da calmodulina (Putkey *et al.*, 1986).

A glucagina é a principal hormona responsável pela produção de glucose hepática através da glicogenólise (Surmely *et al.*, 1999). Quando se inibe experimentalmente a secreção de glucagina por infusão de somatostatina conjuntamente com insulina, de forma a manter os níveis de insulina constantes, a produção hepática de glucose diminui em cerca de dois terços embora a gluconeogénese se mantenha inalterada (Cherrington *et al.*, 1987). Observou-se ainda que um aumento mantido dos níveis de glucagina aumenta inicialmente a glicogenólise, levando posteriormente a um estímulo progressivo da gluconeogénese, resultando num padrão bifásico de produção de glucose hepática: pico inicial seguido de uma estabilização em valores acima dos valores basais (Cherrington *et al.*, 1987).

Em situações de jejum, o fígado recebe lactato, piruvato, aminoácidos e glicerol dos tecidos periféricos, tendo a capacidade de converter estes precursores em glucose para redistribuir. O lactato é produzido no músculo, eritrócitos e medula renal como produto final da glicólise anaeróbia, sendo que o músculo esquelético é responsável por cerca de 40 % da produção de lactato em jejum (Consoli *et al.*, 1992). Os eritrócitos fornecem uma quantidade relativamente constante, mas limitada, de lactato para a gluconeogénese (Cherrington *et al.*, 1987).

A capacidade gluconeogénica do glicerol é limitada porque na lipólise os ácidos gordos livres (AGL) são libertados conjuntamente com o glicerol na razão de 3:1, sendo que estes compostos são tóxicos em concentrações elevadas. Assim, o glicerol contribui com 10-15 % da glucose produzida após um jejum nocturno, e mesmo em situações de jejum prolongado a sua contribuição para a gluconeogénese é de apenas um terço. Os AGL são utilizados como substrato energético por determinados tecidos com

capacidade de os oxidar, o que poupa glucose, e induz a produção de corpos cetónicos que podem também ser utilizados como substrato energético.

A utilização de aminoácidos para a síntese de novo de glucose é o último recurso a que o organismo recorre em situações de jejum prolongado, uma vez que implica a degradação de proteínas. A alanina e a glutamina são os aminoácidos mais relevantes na gluconeogénese durante o jejum prolongado (Hue, 1987).

### **1.1.3.2 Metabolismo extra-hepático da glucose**

No estado basal, a utilização de glucose pelos tecidos é igual à produção endógena de glucose (1.8-2.2 mg/kg/min) (Ferrannini *et al.*, 1989). Os tecidos não dependentes da insulina são responsáveis por cerca de 70 % da utilização basal de glucose. Todos os órgãos e tecidos utilizam glucose como substrato energético, ora de forma facultativa ora imperativa. Utilizadores obrigatórios, tais como o sistema nervoso central e periférico, os eritrócitos, a mucosa intestinal e a medula renal normalmente não podem utilizar substratos alternativos quando a glucose não está disponível. No entanto, após um período de restrição alimentar o cérebro sofre uma adaptação metabólica que lhe permite utilizar corpos cetónicos para substituir até 50 % das suas necessidades habituais de glucose (Owen *et al.*, 1969). Durante este período a concentração plasmática de corpos cetónicos aumenta drasticamente, uma vez que são mobilizados AGL do tecido adiposo para serem convertidos em corpos cetónicos no fígado.

Os utilizadores facultativos de glucose, tal como o tecido muscular, utilizam glucose como primeira opção de substrato energético, mudando para a utilização de AGL quando a disponibilidade de glucose diminui. A alternância entre os dois tipos de metabolismo é controlada por factores humorais e neuronais.

No músculo esquelético, uma pequena fracção da glucose que entra nas células entra na glicólise para ser oxidada, enquanto que a maior parte é armazenada sob a

forma de glicogénio. Esta reserva muscular de glicogénio está assim disponível como suporte oxidativo para esforço muscular de curta duração. O controlo da glicogénese e glicogenólise no músculo esquelético apresenta muitas semelhanças ao que já foi descrito para o fígado, com algumas diferenças notáveis no que diz respeito à regulação hormonal. No músculo esquelético a regulação da actividade dos enzimas do metabolismo do glicogénio está quase na totalidade sob o controlo da insulina, uma vez que não se observa acção da glucagina neste tecido (Dunphy *et al.*, 1998).

As catecolaminas, por seu lado, estimulam a glicogenólise no músculo levando a um aumento dos níveis de glucose-6-fosfato intracelular, a uma inibição do hexocinase e consequente diminuição da captação de glucose por diminuição do gradiente de concentração (Lee *et al.*, 1997). Ao mesmo tempo estimulam a glicólise, o que leva a um aumento do lactato plasmático e aumento da disponibilidade de substrato gluconeogénico para o fígado. Está ainda descrito que a noradrenalina inibe a captação de glucose dependente da insulina no músculo esquelético e tecido adiposo através da estimulação de receptores adrenérgicos  $\beta_2$  (Smith *et al.*, 1984; Lager *et al.*, 1986) tendo sido proposto que a activação destes receptores diminui a ligação da insulina ao seu receptor (Lonnroth *et al.*, 1983), inibe a translocação dos transportadores de glucose para a membrana (Smith *et al.*, 1984) e reduz a actividade intrínseca dos transportadores (Kashiwagi *et al.*, 1983).

No tecido adiposo a insulina estimula o transporte de glucose para os adipócitos de uma forma semelhante à descrita para o músculo. Após entrada no adipócito, a glucose é metabolizada em  $\alpha$ -glicerofosfato que é utilizado na esterificação dos AGL, permitindo o seu armazenamento como TG. Após lipólise, o glicerol libertado dos TG pode ser também utilizado como substrato gluconeogénico pelo fígado.

No rim, a glucose é rapidamente filtrada no glomérulo para ser eficientemente reabsorvida nos túbulos renais. Se a taxa de filtração glomerular estiver dentro dos valores fisiológicos (120 ml/min), só haverá perda de glucose na urina se a concentração

plasmática de glucose ultrapassar os 180 mg/dl (limiar renal de reabsorção para a glucose).

## **1.2 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DA GLUCOSE**

O metabolismo dos glícidos é regulado por diversos factores, nomeadamente, pela concentração plasmática da glucose, por várias hormonas e também pelo sistema nervoso autónomo. A insulina, a principal hormona anabólica, baixa os níveis de glucose plasmática, tanto através da supressão da glicogenólise e gluconeogénese hepática como através da estimulação da captação de glucose pelos tecidos periféricos, nomeadamente o músculo esquelético e tecido adiposo. As acções da insulina são contrariadas pelas hormonas chamadas "contra-reguladoras" cuja libertação é estimulada em condições em que é necessária a mobilização imediata de glucose. A glucagina é a principal hormona responsável pela libertação de glucose pelo fígado.

Para além da regulação hormonal e neuronal existe um outro factor que condiciona a captação de glucose, nomeadamente a sua concentração plasmática. Está descrito que mesmo na ausência de insulina, a captação de glucose continua a ocorrer em todos os tecidos, embora a velocidades mais baixas, devido a uma menor eficiência do sistema de transporte. A título de exemplo, está descrito que no fígado ocorre captação de glucose independente da insulina, desde que a concentração de glucose seja superior a 150 mg/dl (Sweet *et al.*, 1996). Está descrito ainda que o próprio músculo esquelético mantém em 70 % a captação de glucose na ausência de insulina, tendo-se observado em humanos, no estado pós-absortivo, que uma hipoinsulinémia aguda induzida pela infusão de somatostatina levou a uma diminuição de apenas 30 % na captação de glucose pelo músculo esquelético (Bonadonna *et al.*, 1993). Estes resultados sugerem a existência de outros factores, para além da insulina, que modulam a captação de glucose pelos tecidos, tendo sido propostos vários mecanismos hipotéticos

nomeadamente o gradiente de glucose entre o interstício e o citoplasma (Bonadonna *et al.*, 1993), ou mesmo factores humorais com propriedades insulino-miméticas (Lautt, 1980; Petersen *et al.*, 1994).

### **1.2.1 Regulação Hormonal**

#### **1.2.1.1 Insulina: perspectiva histórica, síntese e acção**

A descoberta da insulina é atribuída a Frederick Banting e Charles Best que demonstraram, no Verão de 1921, a acção terapêutica de um princípio activo, extraído do pâncreas, sobre cães diabéticos. A descoberta da insulina e o início do seu uso na terapêutica da diabetes é um dos marcos da medicina do século XX. Mais de 80 anos passaram desde que se injectou pela primeira vez insulina no jovem diabético Leonard Thomson, internado num hospital de Toronto no Canadá, acontecimento que representou uma revolução na terapêutica da diabetes e que abriu as portas a Banting e Best para o Prémio Nobel em Fisiologia e Medicina em 1923.

Falando em particular da diabetes em Portugal, é impossível não referir a Associação Protectora do Diabéticos de Portugal (APDP), cujo nome está intimamente ligado à luta contra a doença no nosso país. A APDP foi fundada em 13 de Maio de 1926 pelo Dr. Ernesto Roma, sendo reconhecida internacionalmente como a mais antiga associação de diabetes do mundo (Lisboa, 1975). O Dr. Roma encontrava-se nos Estados Unidos da América a realizar um estágio de especialização aquando dos primeiros ensaios clínicos em que se administrou insulina a doentes diabéticos e os impressionantes resultados obtidos levaram-no a fundar a APDP, originalmente sob o nome de Associação Protectora dos Diabéticos Pobres, com o intuito de fornecer insulina gratuita aos diabéticos mais necessitados. Ficam para a história as palestras dirigidas pelo Dr. Roma aos doentes, em que se focavam temas como a dieta, autovigilância, alimentação e



actividade física, revolucionárias no Portugal dos anos 20 especialmente porque eram dirigidas aos “diabéticos pobres”. Ernesto Roma foi autor de uma obra incomensurável, sendo hoje considerado o fundador do movimento associativo dos diabéticos e, segundo Manuel Sá Marques, o pai da Diabetologia Social.

A insulina é a principal hormona na regulação da captação de glucose. A sua síntese ocorre no pâncreas endócrino, mais concretamente nos ilhéus pancreáticos ou ilhéus de Langerhans que são estruturas ovais, constituídas por células poligonais pequenas, altamente vascularizadas e que possuem várias terminações nervosas. Cada ilhéu pancreático contém quatro tipos de células produtoras de hormonas: células  $\alpha$  que representam cerca de 20 % das células dos ilhéus pancreáticos, secretoras de glucagina; células  $\beta$  que representam 70 % das células dos ilhéus pancreáticos, secretoras de insulina; células  $\delta$  que constituem cerca de 5 % das células dos ilhéus, secretoras de somatostatina e células PP que constituem cerca de 5 % das células dos ilhéus, secretoras do polipéptido pancreático (Pickup, 2003).

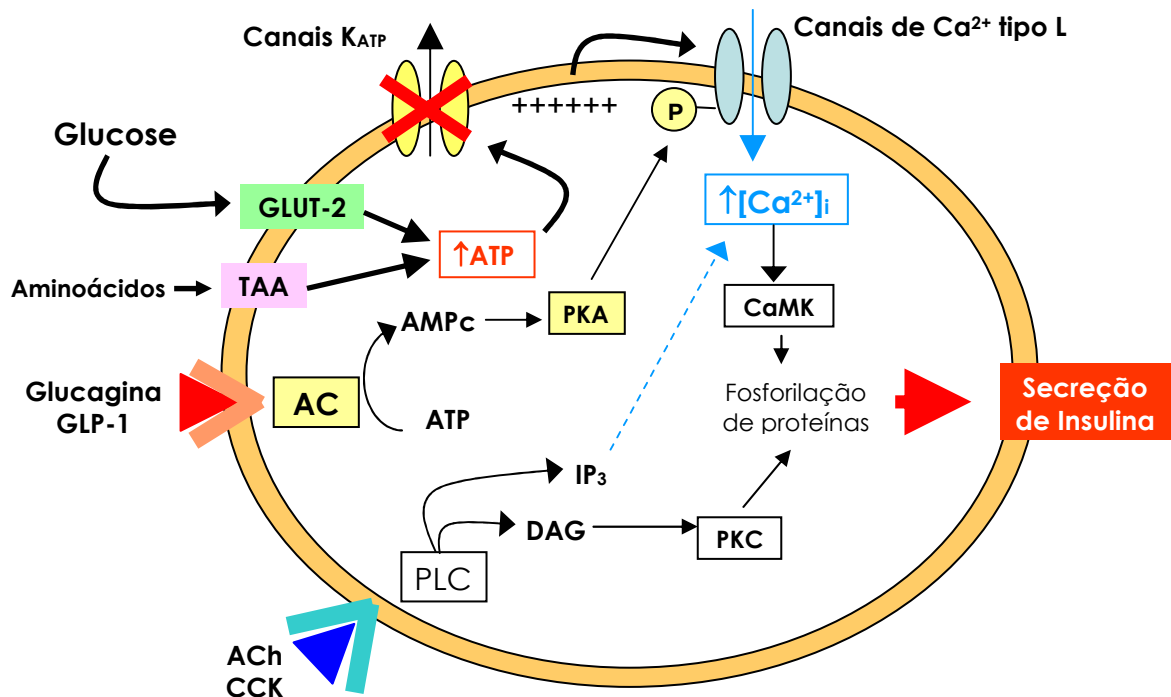
A secreção de hormonas pelos vários tipos de células dos ilhéus pancreáticos ocorre através de um mecanismo comum a todas as células em que os grânulos secretores são mobilizados para a membrana plasmática, sendo o seu conteúdo libertado posteriormente para o espaço extracelular por exocitose (Pickup, 2003).

A vascularização do centro para a periferia do ilhéu desempenha um papel importante na regulação do pâncreas endócrino. No ilhéu de Langerhans, o fluxo de sangue é centrífugo, iniciando-se no centro do ilhéu, rico em células  $\beta$ , e projectando-se para as células  $\alpha$ ,  $\delta$  e PP, localizadas na periferia. Este sistema permite a regulação da secreção hormonal pelos vários tipos de células que compõem os ilhéus de Langerhans, através de efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos dos seus produtos secretados, como por exemplo, a insulina secretada na região central do ilhéu é transportada pela

corrente sanguínea para a periferia onde inibe a libertação de glucagina pelas células  $\alpha$  (Pickup, 2003).

A insulina é uma pequena proteína constituída por 51 aminoácidos e massa molecular de 5,5 kDa. A sua biossíntese ocorre nos ribossomas das células  $\beta$ , sendo precedida da formação da proinsulina que é constituída pela cadeia A, que possui 21 aminoácidos ligados por uma ponte persulfureto intrapeptídica ligando os 6º e 11º aminoácidos; a cadeia B, que possui 30 aminoácidos e está ligada à cadeia A por duas pontes persulfureto entre as posições B1 e A1 e B19 e A20, e pela cadeia C que é um péptido de ligação intercalado entre as cadeias A e B (Pickup, 2003). A insulina resulta da clivagem enzimática da proinsulina, sendo constituída pelas cadeias A e B ligadas pelas respectivas pontes persulfureto. Após a sua síntese, a insulina é armazenada nos grânulos secretores da célula  $\beta$  sob a forma de complexo hexamérico cristalino com 2 átomos de zinco por hexâmero (Barg *et al.*, 2004), podendo ser armazenada durante vários dias. Quando a secreção da hormona é estimulada ocorre dissolução do cristal com subsequente libertação da insulina, sob a forma monomérica, para a corrente sanguínea, onde se encontra numa concentração basal de cerca de 10 $\mu$ U/ml. Após uma refeição normal, estes valores aumentam até cerca de 100 $\mu$ U/ml, o que ocorre 8-10 minutos após a ingestão dos alimentos, sendo os valores basais retomados cerca de 90 a 120 minutos depois (Leong, 2001).

Em resposta a elevados níveis de glucose, a insulina é prontamente libertada dos ilhéus pancreáticos. Com excepção da fracção que se combina com os receptores nas células alvo, a insulina é degradada no fígado e rim. Os mecanismos fisiológicos que regulam a secreção da insulina estão representados na figura 1.1.



**Figura 1.1:** Regulação da secreção da insulina. A glucose atravessa a membrana plasmática da célula  $\beta$  do pâncreas através de transportadores específicos, os GLUT-2, enquanto que os aminoácidos utilizam transportadores de aminoácidos (TAA). Estes nutrientes estimulam a secreção da insulina promovendo um aumento nos níveis intracelulares de cálcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), por encerramento dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ) e à abertura de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes da voltagem do tipo L. O aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular activa o cinase dependente do cálcio/calmodulina II (CaMKII) que inicia uma cascata de fosforilação de proteínas que conduzem à secreção da insulina. Os agonistas de receptores que activam o adenilato ciclase, tais como a glucagina e o *glucagon-like peptide* (GLP-1) potenciam a secreção de insulina através da activação do proteína cinase A (PKA) induzida pela produção de 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). A PKA fosforila os canais de  $Ca^{2+}$  dependentes da voltagem conduzindo a um aumento do influxo de iões para o citoplasma. Agonistas de receptores acoplados à fosfolipase C (PLC), tais como a acetilcolina (ACh) e a colecistocinina (CCK), podem activar a CaMKII através da mobilização das reservas de  $Ca^{2+}$  intracelular mediada pelo 1,4,5-trifosfato de inositol ( $IP_3$ ), activando simultaneamente isoformas do proteína cinase C (PKC) através da formação de diacilglicerol (DAG). Adaptado de (Pickup, 2003) .

A glucose é o estímulo mais eficaz para a libertação de insulina, entrando nas células  $\beta$  por difusão passiva, através do transportador GLUT-2. Uma vez que este possui um elevado  $K_m$ , esta proteína transporta mais eficazmente a glucose durante o estado de hiperglicémia do que em hipoglicémia. Após a entrada de glucose nas células  $\beta$  esta é fosforilada pelo enzima glucocinase, originando G6-P que é metabolizada para gerar ATP. O ATP formado liga-se a canais de  $K^+$ -sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), levando ao seu encerramento, à despolarização da célula  $\beta$  e subsequente entrada de  $Ca^{2+}$  no citoplasma através de canais de  $Ca^{2+}$  dependentes da voltagem do tipo L. A insulina é libertada, conjuntamente com o péptido C, por exocitose induzida pelo  $Ca^{2+}$  através da activação do cinase dependente da calmodulina II (CaMKII) (Jones *et al.*, 1998).

Para além da glucose existem outros iniciadores da secreção de insulina que actuam na ausência de glucose, nomeadamente os aminoácidos leucina, arginina e lisina (Wollheim *et al.*, 1981). A leucina entra na célula  $\beta$  através de um transportador independente de  $Na^+$  sendo depois metabolizada em ATP, o que leva a uma alteração da permeabilidade da membrana celular ao potássio e a uma despolarização semelhante, embora de magnitude inferior, ao mecanismo supra-descrito para a glucose (Henquin *et al.*, 1986). Os aminoácidos com carga iónica, arginina e lisina, atravessam a membrana plasmática através de um transportador de catiões e despolarizam directamente a célula  $\beta$  por acumulação de cargas positivas no citoplasma, levando à abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  dependentes da voltagem e subsequente influxo de  $Ca^{2+}$  (Wollheim *et al.*, 1981).

A resposta secretora da célula  $\beta$  à glucose pode ainda ser potenciada por outros agentes insulíntrópicos, nomeadamente a glucagina, *glucagon-like peptide* (GLP-1), colecistocinina (CCK) e acetilcolina (ACh). Enquanto que a glucagina e GLP-1 potenciam a secreção de insulina por activação do proteína cinase dependente do AMPc (PKA), através da via do adenilato ciclase, a CCK e ACh actuam através da via do

fosfolipase C (PLC)/ 1,4,5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>)/ diacilglicerol (DAG), tal como representado na figura 1.1.

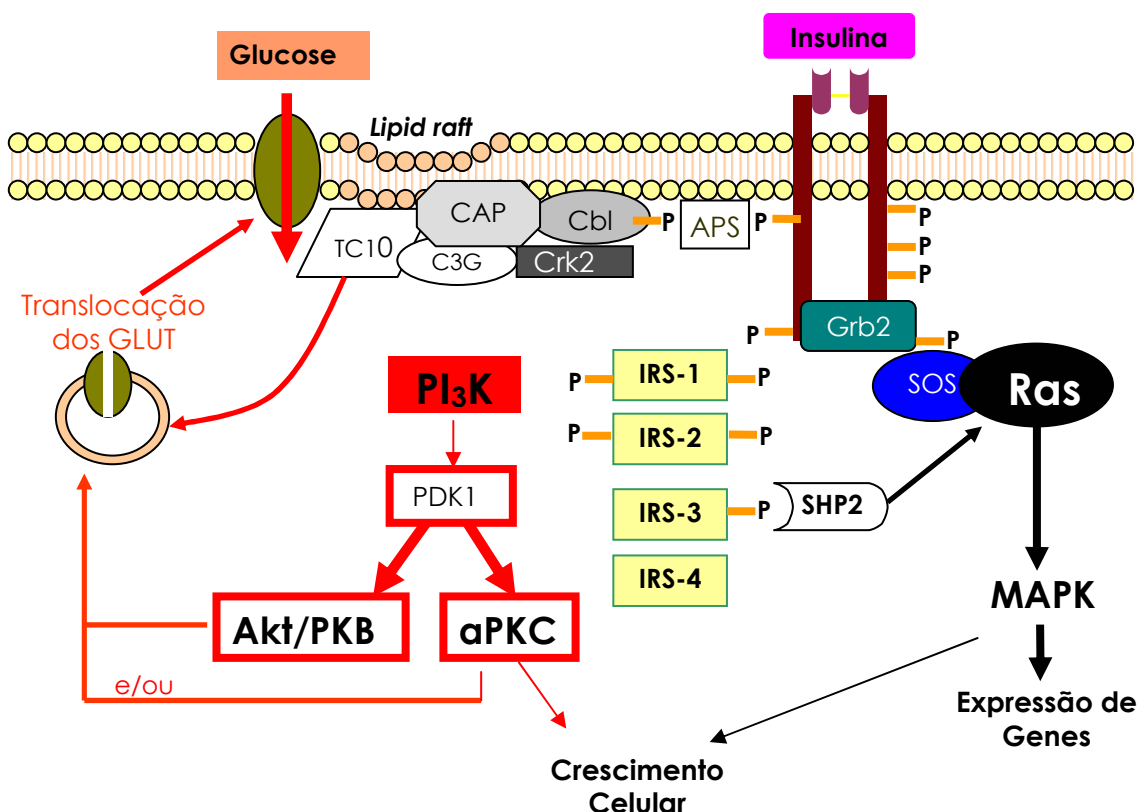
Os agentes que activam o AC levam a um aumento dos níveis intracelulares de AMPc e à activação do PKA que sensibiliza a maquinaria secretora da célula  $\beta$  através da fosforilação de proteínas intracelulares. Nomeadamente, o PKA fosforila os canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes da voltagem do tipo L existentes na membrana plasmática da célula  $\beta$ , levando a um aumento da amplitude da corrente de Ca<sup>2+</sup> e a maior influxo de iões para o citoplasma (Leiser *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2002) Estes potenciadores são ineficazes a concentrações de glucose sub-estimulatórias, sendo por isso designados de secretagogos da insulina dependentes da glucose (Doyle *et al.*, 2003).

Já os secretagogos da insulina que conduzem à formação de IP<sub>3</sub> e DAG actuam através da mobilização das reservas intracelulares de cálcio levando a um aumento do Ca<sup>2+</sup> citoplasmático e estimulando directamente a secreção de insulina (Wollheim *et al.*, 1981). O DAG, por sua vez activa o proteína cinase C (PKC) que parece também desempenhar um papel na secreção da insulina pela célula  $\beta$  (Persaud *et al.*, 1993).

Tal como muitas outras hormonas, a insulina é libertada sob a forma de pulsos de alta-frequência (pulsos de 5 a 10 min), o que resulta em concentrações oscilatórias desta hormona no sangue periférico no estado de jejum (Bergsten, 2000; Schmitz *et al.*, 2002). Este padrão oscilatório parece ser importante no controlo da secreção da insulina e também na sua acção, uma vez que se observou que a administração pulsátil exerce um efeito hipoglicemiante superior à administração contínua da mesma dose de insulina (Paolisso *et al.*, 1988; Reid *et al.*, 2004). Está descrito que na diabetes tipo 2 as oscilações na insulina plasmática basal são muito mais irregulares do que nos indivíduos saudáveis, tendo sido proposto que a ausência de um padrão de pulsatilidade leva à *down-regulation* dos receptores de insulina e à intolerância à glucose que caracteriza a doença (Lang *et al.*, 1982). Para além deste padrão pulsátil basal, após uma refeição a insulina é libertada de acordo com um padrão bifásico, que consiste numa fase inicial

aguda que dura cerca de 10 min seguida de uma segunda fase de libertação que persiste durante todo o estímulo hiperglicémico (Rorsman *et al.*, 2003).

Os tecidos alvo clássicos da insulina são o fígado, músculo e tecido adiposo. Esta hormona exerce os seus efeitos biológicos ligando-se a um receptor da membrana plasmática da célula alvo. O receptor da insulina é um tetrâmero glicosilado constituído por duas cadeias  $\alpha$  extracelulares onde a molécula de insulina se liga e por duas cadeias  $\beta$  transmembranares que têm actividade de tirosina cinase (Pickup, 2003). A figura 1.2 representa as vias de transdução de sinal do receptor da insulina.



**Figura 1.2:** Via de transdução de sinal do receptor da insulina. A activação do receptor da insulina resulta na fosforilação dos resíduos de tirosina dos substratos para o receptor da insulina (IRS 1 a 4). Os IRS fosforilados ligam-se e activam vários mediadores intracelulares, nomeadamente o cinase do 3- fosfatidil-inositol (PI3K), o proteína tirosina fosfatase SHP2 (tirosina fosfatase com domínios Src-2), ou o complexo Grb2 (proteína associada ao receptor para o factor de crescimento 2)/SOS (son of sevenless). Este último regula a activação da proteína Ras que, por sua vez, activa a via das MAPK, levando a um aumento da actividade transcripcional e ao crescimento celular. A activação da PI3K pelos IRS resulta na fosforilação do cinase dependente dos fosfolípidos (PDK) que activa o proteína cinase B ou Akt que promove a translocação dos transportadores de glucose GLUT-4 para a membrana plasmática em concertação com as isoformas atípicas do proteína cinase C (αPKC). Foi recentemente descrita uma segunda via de sinalização que conduz à translocação de GLUT-4 para a membrana e que envolve a fosforilação de resíduos de tirosina da proteína Cbl, através de uma proteína adaptadora intermediária designada por APS. A Cbl fosforilada interage com a proteína CAP que promove a ancoragem do complexo Cbl/CAP em microdomínios da membrana plasmática designados por *lipid rafts*. A este complexo ligam-se a proteína adaptadora Crk2 e o factor de troca de nucleótidos de guanina C3G. O recrutamento do C3G resulta na activação da proteína G, TC10, que induz os rearranjos necessários no citoesqueleto para facilitar a translocação dos GLUT-4. Adaptado de (Saltiel *et al.*, 2001).

Quando a insulina se liga ao receptor promove autofosforilação de pelo menos sete resíduos de tirosina da cadeia  $\beta$ , que por sua vez iniciam uma cascata de fosforilações de proteínas intracelulares especificamente associadas à subunidade  $\beta$  do receptor, os substratos para o receptor de insulina (IRS), dos quais se conhecem 4 isoformas (IRS-1 a 4) (Pickup, 2003). Os IRS fosforilados interagem com proteínas que possuam o domínio 2 de homologia com a oncoproteína Src (Src-2), tais como a proteína *son of sevenless* (SOS) e o fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K), promovendo assim várias respostas biológicas. A activação da proteína SOS conduz directamente à estimulação da via da proteína Ras/proteína cinase activada por mitogénios (MAPK) que vai aumentar a actividade transcricional (Pickup, 2003).

A activação da via da PI3K está directamente envolvida na translocação das vesículas que contém GLUT-4 do citosol para a membrana plasmática sendo, por isso, uma das mais bem estudadas. Este enzima é activado quando os seus domínios Src-2 são ocupados pelos resíduos de fosfotirosina do IRS-1 ou IRS-2, gerando vários produtos fosfolípidicos que, por sua vez, vão activar serina/treonina cinases com domínios de homologia para a plecstrina (domínios PH), tais como o proteína cinase B (PKB ou Akt) e o PKC (Pickup, 2003). O PKB e o PKC são responsáveis pela translocação dos GLUT-4, conduzindo assim à entrada de glucose nas células onde esta é armazenada sob a forma de glicogénio ou utilizada como substrato energético na síntese de proteínas ou ácidos gordos. Estes cinases estimulam também a síntese proteica, a síntese de glicogénio e a proliferação celular mediadas pela insulina em diversos tecidos (Alessi *et al.*, 1998).

Recentemente foi descrita uma nova via de sinalização através da qual a insulina promove a translocação dos GLUT-4 (Baumann *et al.*, 2000). Esta via envolve a fosforilação de resíduos de tirosina da proteína Cbl em resposta à ligação da insulina ao seu receptor. As proteínas Cbl são fosforiladas e recrutadas com o auxílio de uma proteína adaptadora intermediária designada por proteína APS (proteína adaptadora



com domínios de homologia com a plecstrina e domínios Src-2) que funciona como local de ancoragem para a Cbl. Uma outra proteína adaptadora, designada por CAP (proteína adaptadora associada à Cbl), interage com zonas especializadas da membrana plasmáticas designadas por *lipid rafts* e, em conjunto com a proteína Cbl e outros mediadores proteicos, nomeadamente a proteína G (proteína com locais de ligação para o GTP) TC10, estimula directamente a translocação dos transportadores de glucose para a membrana, através de uma via de sinalização independente da PI3K (Saltiel *et al.*, 2001; Gupte *et al.*, 2006). Está descrito que a fosforilação da Cbl mediada pela insulina e a activação da TC10 estão diminuídas nos adipócitos e cardiomiócitos de animais obesos (Gupte *et al.*, 2006).

#### **1.2.1.2 Outras hormonas**

Para além da insulina, várias outras hormonas, péptidos e neurotransmissores contribuem para a homeostasia da glucose. A glucagina é um péptido de 29 aminoácidos sintetizado a partir da proglucagina. É uma hormona hiperglicemiante e também um potente estimulador da secreção de insulina uma vez que promove o aumento dos níveis de AMPc na célula  $\beta$ . Os receptores da glucagina estão associados a uma proteína G estimulatória (Gs) que activa a AC, levando à activação do PKA que, como já foi anteriormente referido, sensibiliza a capacidade secretora da célula  $\beta$  aos iões cálcio através da fosforilação de proteínas intracelulares (figura 1.1) (Pickup, 2003).

A libertação da glucagina é induzida pela hipoglicémia e também por determinados aminoácidos e pelas hormonas adrenalina, CCK, gastrina e hormona de crescimento (Pickup, 2003). A secreção da glucagina é inibida pela hiperglicémia, pelos AGL e também pela insulina e somatostatina. A glucagina é um importante activador da glicogenólise através da activação do PKA, levando à activação do fosforilase do glicogénio (Pickup, 2003).

A somatostatina é produzida pelas células  $\delta$  dos ilhéus pancreáticos, estando também presente nas células D do intestino e em terminais nervosos (Pickup, 2003). É um potente inibidor da secreção de insulina, glucagina e polipéptido pancreático. A inibição da secreção da insulina parece estar associada a uma diminuição na formação de AMPc (Sharp, 1996), conjuntamente com a activação de proteínas G que abrem canais de potássio levando à hiperpolarização da membrana da célula  $\beta$  e a um decréscimo nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Nilsson *et al.*, 1989). A secreção de somatostatina é estimulada pela glucose, aminoácidos, AGLs e corpos cetónicos e é inibida pela insulina.

Existe ainda um grupo de hormonas, designadas no seu conjunto por incretinas que constituem o eixo entero-insular. As incretinas actualmente conhecidas são o péptido inibitório gástrico (GIP) e o *glucagon-like peptide* (GLP-1) (Meier *et al.*, 2006). Estas hormonas desempenham um importante papel na potenciação da resposta da insulina aos nutrientes, sendo secretadas pelos enterócitos em resposta à ingestão de hidratos de carbono, proteínas e gorduras.

### **1.2.2 Regulação neuronal**

A relação funcional entre o sistema nervoso e a homeostasia da glucose foi pela primeira vez descrita por Claude Bernard, há mais de um século, quando este reputado fisiologista observou que a punção do 4º ventrículo induzia diabetes em animais ("piqûre diabétique") (Schwartz *et al.*, 2005). Posteriormente, Langerhans descreveu que os ilhéus  $\beta$  são ricamente enervados por fibras nervosas autónomas que desempenham um papel importante na modulação da secreção humoral destas células. Trabalhos pioneiros realizados por Shimazu *et al.* evidenciaram também o controlo nervoso do metabolismo hepático e a sua importância na regulação da glicémia (Shimazu *et al.*, 1968b). Embora a descoberta da insulina em 1921 tenha desviado a atenção da comunidade científica

para o controlo humoral da glicémia, em detrimento do controlo neuronal, esta área tem sido uma das mais prolíficas em termos de conhecimento *de novo* nos últimos anos.

Os ilhéus pancreáticos são enervados por fibras colinérgicas, adrenérgicas e peptidérgicas, também designadas por fibras NANC (não-colinérgicas-não-adrenérgicas) (Havel *et al.*, 1994). O pâncreas recebe a sua enervação do plexo celíaco, sendo que a estimulação parassimpática que ocorre imediatamente antes e durante as refeições aumenta a secreção de insulina enquanto que a noradrenalina libertada das terminações nervosas simpáticas, bem como as catecolaminas circulantes, actuam através de receptores  $\alpha_2$  para inibir a secreção de insulina (Havel *et al.*, 1994). O aumento do tónus simpático é também um potente estímulo para a secreção de glucagina pelas células  $\alpha$  do ilhéu.

O fígado representa um órgão de primeira linha na manutenção da homeostasia da glucose, principalmente através da acção do sistema nervoso autónomo. A hipoglicémia induz uma resposta autonómica dominada pelo sistema nervoso simpático que induz um aumento na produção hepática de glucose de forma a manter a euglicémia. Esta resposta é mediada por estimulação simpática directa do fígado e envolve a activação do fosforilase do glicogénio e, consequentemente, da glicogenólise (Shimazu *et al.*, 1968a; Shimazu *et al.*, 1968b). Os nervos parassimpáticos hepáticos desempenham também um papel primordial na regulação da glicémia, tendo sido demonstrado recentemente que a produção de glucose hepática está significativamente aumentada em ratos submetidos a vagotomia hepática selectiva (Matsuhisa *et al.*, 2000). Em trabalhos mais antigos já se tinha demonstrado que a desnervação parassimpática hepática diminuía a formação de glicogénio no fígado (Mondon *et al.*, 1971) e que a estimulação do ramo hepático do vago activava o sintase do glicogénio (Shimazu *et al.*, 1965).

Em 1997, na Alemanha, Lautt sugeriu pela primeira vez que os nervos parassimpáticos hepáticos controlam a libertação pelo fígado de uma substância que sensibiliza o

músculo esquelético à acção da insulina, designada por HISS (Lautt, 2004). A hipótese que suporta a existência deste factor humoral será discutida mais à frente nesta introdução.

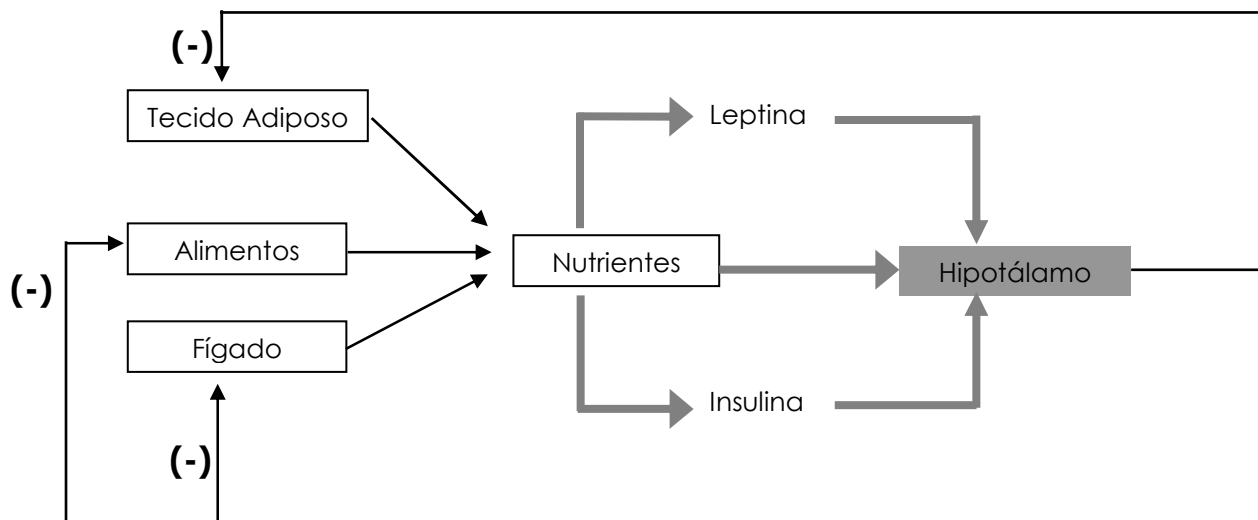
A importância do fígado no arco reflexo neuronal para a regulação da glicémia tem sido objecto de estudo exaustivo nas últimas décadas. A acção desta via neuronal é a contra-regulação da hipo ou hiperglicémia no sentido de manter a homeostasia da glucose, tanto em condições fisiológicas como patológicas. A disponibilidade da glucose é detectada por neurónios sensores de glucose no hipotálamo e sistema portal hepático, neurónios estes que possuem um mecanismo de detecção da glicémia semelhante ao da célula  $\beta$  e desempenham um papel relevante na resposta neuroendócrina às alterações na glicémia (Nijima, 1986). Está descrito que a frequência de disparo dos nervos aferentes hepáticos é inversamente proporcional à concentração de glucose no sangue portal (Nijima, 1981), no entanto o mesmo não se observa com outras hexoses ou pentoses (Nijima, 1969). Sakagushi demonstrou em 1988 que a resposta contra-reguladora do sistema nervoso simpático apresenta uma correlação mais forte com a glicémia do sangue portal hepático do que com a glicémia arterial (Sakaguchi *et al.*, 1988)

Uma outra área intensamente debatida nas últimas décadas relaciona-se com o papel do cérebro na regulação metabólica (Baskin *et al.*, 1999; Obici *et al.*, 2002; Gerozissis, 2003; Schwartz *et al.*, 2005). As áreas chave envolvidas no balanço energético incluem o hipotálamo e também o núcleo do tracto solitário na medula, onde são projectados os neurónios sensoriais dos aferentes vagais que transmitem sinais de saciedade tais como a distensão gástrica e o aumento da concentração de glucose na veia porta (Oomura *et al.*, 1984). Sabe-se que o hipotálamo se encontra acessível a hormonas que funcionam como sinais nutricionais no sistema nervoso central (SNC) e que incluem a insulina, leptina, grelina, CCK e GLP-1 (Gerozissis, 2003). Ao contrário do que se pensava há algumas décadas atrás, a insulina atravessa a barreira hemato-encefálica,

através de transporte mediado pelo receptor da insulina, no hipotálamo mediobasal, uma área intimamente envolvida na homeostasia energética (Banks, 2004; Plum *et al.*, 2005). Os níveis de insulina no cérebro estão directamente relacionados com os níveis de insulina circulante, encontrando-se diminuídos durante os períodos de jejum e aumentados após uma refeição (Schwartz *et al.*, 1992; Gerozissis *et al.*, 1997). Observou-se que cada macronutriente exerce um efeito específico na insulina hipotalâmica, tendo sido demonstrado que os níveis cerebrais desta hormona aumentam após uma refeição de hidratos de carbono, não são alterados por refeições proteicas e diminuem após uma refeição exclusivamente lipídica (Gerozissis *et al.*, 1997; Orosco *et al.*, 2001).

Trabalhos recentes sugerem ainda que ocorre biossíntese de insulina no sistema nervoso central (Schwartz *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2001) e que existem receptores de insulina expressos no cérebro nos núcleos hipotalâmicos paraventricular e arcuato, bulbo olfactivo, plexo coróide, hipocampo, córtex e tronco cerebral (Baskin *et al.*, 1999). Para além da regulação da insulina cerebral pelos nutrientes e hormonas circulantes, foi também descrito um controlo local da biossíntese de insulina no hipotálamo, mediado pela glucose e serotonina (Orosco *et al.*, 2001).

Foi recentemente proposto por Obici *et al.* um modelo segundo o qual a insulina desempenha no hipotálamo um importante papel na regulação do metabolismo, juntamente com a leptina (Obici *et al.*, 2002), que se encontra representado na figura 1.3.



**Figura 1.3:** Modelo da homeostasia de nutrientes proposto por Obici *et al.* O esquema representa as principais fontes de nutrientes: consumo de calorias exógenas, produção de glucose hepática e lípidos. Os nutrientes circulantes estimulam a produção de leptina e insulina que, por sua vez, activam vias centrais eferentes através dos seus receptores hipotalâmicos e inibem o apetite, a produção de glucose hepática e a lipólise. O hipotálamo activa respostas neuronais de retroacção negativa no comportamento alimentar e na produção de glucose. Adaptado de (Obici *et al.*, 2002).

Segundo este modelo, o sistema nervoso central processa informação proveniente dos níveis de insulina, leptina e nutrientes circulantes, e responde ajustando o apetite, modulando o sistema nervoso autónomo e regulando o metabolismo de substratos de forma a promover a homeostasia energética (Obici *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2005).

A insulina hipotalâmica desempenha um papel crucial nesta regulação, como o demonstram experiências em que se observou que a microinfusão crónica de insulina no hipotálamo rostromedial de ratos exerceu efeitos anorexigénicos e induziu uma perda ponderal permanente (Nicolaidis, 1981). Mais recentemente constatou-se que a deleção, exclusiva no hipotálamo, do gene que codifica o receptor de insulina originou um fenótipo de hiperfagia, obesidade, resistência à insulina e intolerância à glucose (Bruning *et al.*, 2000). Embora os mecanismos moleculares da acção da insulina no hipotálamo

não sejam ainda totalmente conhecidos, várias hipóteses têm sido sugeridas. Foi recentemente proposto que a insulina modula a produção hepática de glucose através da activação de canais  $K_{ATP}$  no hipotálamo, uma vez que a abertura de canais  $K_{ATP}$  com diazóxido administrado por via intracerebroventricular induziu uma redução na produção de glucose hepática (Pocai *et al.*, 2005). Minokoshi *et al.* propuseram ainda um hipotético mecanismo através do qual a insulina e a leptina regulam o apetite através da sua acção nos neurónios hipotalâmicos, e que consiste na inibição da proteína cinase activado pelo AMP (AMPK), um sensor metabólico que responde à diminuição dos níveis intracelulares de ATP (Minokoshi *et al.*, 2004).

### **1.2.3 Exercício físico**

A contracção muscular e o exercício físico prolongado aumentam a sensibilidade à insulina no músculo esquelético (Borghouts *et al.*, 2000), tendo sido proposto que existem pelo menos 2 vias de sinalização distintas que estimulam a captação de glucose neste órgão. Uma das vias é estimulada pela insulina ou pelo IGF-1 (*insulin-like growth factor*) e requer a activação do enzima  $PI_3K$ , ou da via da proteína Cbl, para activação do transporte de glucose (Cheatham *et al.*, 1994; Saltiel *et al.*, 2001). A outra via de sinalização é normalmente designada por via da contracção ou da hipóxia e é independente da activação da  $PI_3K$  e da presença de insulina (Lund *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2005). A captação de glucose induzida pela contracção poderá ser mediada pela produção de monóxido de azoto (NO) no músculo esquelético (Bradley *et al.*, 1999) e/ou pela via da proteína cinase activada pelo AMP (AMPK), que será discutida mais à frente neste capítulo (Hutber *et al.*, 1997).

Estudos realizados por diferentes grupos demonstraram que o NO modula a captação de glucose pelo músculo esquelético (Balon *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1997b). Efectivamente, duas das isoformas da sintase do monóxido de azoto (NOS) são expressas

no músculo esquelético, o NOS endotelial (eNOS) e o NOS neuronal (nNOS) (Kobzik *et al.*, 1994). O nNOS está localizado na região sub-sarcolemal e na junção neuromuscular do (Kusner *et al.*, 1996), enquanto que o eNOS se encontra uniformemente distribuído nas fibras musculares, bem como no endotélio dos vasos (Kobzik *et al.*, 1995).

Sabe-se que o exercício físico activa o NOS em músculos gastrocnémios (Roberts *et al.*, 1999) e que a estimulação eléctrica usada para gerar actividade contráctil leva a um aumento da produção de NO em células de músculo esquelético em cultura (Balon *et al.*, 1994). Observou-se que a administração exógena de um dador de NO estimula a captação de glucose em culturas primárias de músculo esquelético (Balon *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1997b), por aumento da expressão dos transportadores GLUT-4 na membrana plasmática (Etgen *et al.*, 1997b), e que o exercício físico também induz um aumento da expressão de GLUT-4 no sarcolema (Etgen *et al.*, 1997a; Roberts *et al.*, 1997). Constatou-se ainda que a inibição farmacológica do NOS bloqueia o aumento da captação de glucose induzida pelo exercício físico (Roberts *et al.*, 1997). Em função destes resultados foi proposta a hipótese de que o NO é necessário para promover a captação de glucose no músculo esquelético, através de um mecanismo independente da acção da insulina (Balon *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1997b).

Foi também proposto que o aumento da captação de glucose que se observa após o exercício físico se deve exclusivamente a factores hemodinâmicos, uma vez que o exercício agudo aumenta o fluxo sanguíneo total (Hudlicka *et al.*, 1985) e o recrutamento de capilares (Honig *et al.*, 1982), promovendo um maior aporte de glucose ao músculo e facilitando a sua captação por aumento da disponibilidade de substrato (Grubb *et al.*, 1977). No entanto esta hipótese é contrariada por estudos em que não se observaram alterações na capilarização após o exercício físico (Ebeling *et al.*, 1993) e também por estudos com preparações de músculos de animais submetidos a exercício crónico em que a captação de glucose está aumentada *in vitro*, portanto sem a influência de factores hemodinâmicos (Etgen *et al.*, 1997a).



### 1.3 FISIOPATOLOGIA DA RESISTÊNCIA À INSULINA

A resistência à insulina define-se como uma situação em que ocorre uma resposta biológica insuficiente à insulina endógena ou exógena. Numa situação de resistência à insulina surge uma hiperinsulinémia compensatória que depende da capacidade adaptativa da célula  $\beta$  do pâncreas, e que procura manter a homeostasia da glicémia. Quando ocorre exaustão ou falência da célula  $\beta$  surge a hiperglicémia e a diabetes *mellitus*.

O estudo da resistência à insulina é uma área em franca expansão, uma vez que muitas das suas características etiopatogénicas permanecem por esclarecer. Tal facto justifica o propósito deste trabalho que procura elucidar alguns dos mecanismos fisiopatológicos que lhe estão subjacentes. Neste capítulo pretende-se abordar algumas das hipóteses explicativas para a etiologia da resistência à insulina.

#### 1.3.1 Factores genéticos

Vários estudos epidemiológicos demonstraram que existe uma componente familiar na síndrome metabólica, sugerindo a existência de factores genéticos a condicionar os efeitos ambientais no surgimento das manifestações da resistência à insulina (Kahn, 1994; Hanis *et al.*, 1996; Elbein *et al.*, 1999; An *et al.*, 2005). A fim de identificar os genes envolvidos na resistência à insulina, procuraram-se inicialmente os candidatos na via de sinalização intracelular iniciada pela ligação da insulina ao seu receptor membranar.

Assim, foi proposto que mutações nos genes que codificam para o receptor da insulina, substratos do receptor da insulina (IRS-1 e IRS-2) (Withers *et al.*, 1998), o enzima PI3K (Shepherd *et al.*, 1998), o enzima glucocinase (Fajans *et al.*, 2001) e os transportadores de glucose GLUT-4 (O'Rahilly *et al.*, 1992; Pontiroli *et al.*, 1996), poderiam estar envolvidos na etiopatogenia da resistência à insulina (ver figura 1.2).

Estudos em animais transgênicos demonstraram que mutações silenciadoras dos genes do receptor da insulina, IRS-1 e IRS-2 causam resistência à insulina, com um fenótipo semelhante ao que ocorre na espécie humana (Kahn *et al.*, 2000). Mais ainda, observou-se que a deleção selectiva do gene do receptor da insulina em tecidos específicos conduziu a diferentes fenótipos de acordo com o tecido em que o receptor da insulina foi deletado. Assim, *knock-outs* condicionais do receptor da insulina no fígado (Michael *et al.*, 2000) ou no cérebro (Bruning *et al.*, 2000) mostraram intolerância à glucose e resistência à insulina, enquanto que a deleção selectiva do receptor da insulina no músculo esquelético (Bruning *et al.*, 1998) ou tecido adiposo (Bluher *et al.*, 2003) não foi suficiente para causar hiperglicémia (Lauro *et al.*, 1998). Esta surpreendente descoberta aponta assim para o fígado e SNC como os órgãos-chave na regulação da sensibilidade à insulina.

Está descrito também que o gene do PI3K, quando inactivado, manifesta-se por uma forma de síndrome de resistência à insulina com um fenótipo sugestivo de acromegália.

Embora tenham sido já identificados vários genes associados à resistência à insulina, a sua etiologia é geralmente poligénica, não sendo normalmente possível explicar o fenótipo com um defeito genético único. Uma das hipóteses mais interessantes que tenta abordar a questão da etiologia poligénica da resistência à insulina é conhecida como hipótese dos "thrifty genes" ou genes de poupança (Neel, 1962). Segundo esta teoria, a espécie humana adaptou-se ao longo de milhares de anos a situações de escassez nutricional, desenvolvendo mecanismos de defesa favorecedores do armazenamento energético em detrimento do gasto de energia. Assim, foram seleccionados naturalmente os indivíduos com um genótipo dito de poupança, que assegurassem um eficiente armazenamento de reservas para fazer face aos períodos de jejum prolongado. Com o desenvolvimento das sociedades e consequente alteração dos estilos de vida, esta vantagem selectiva perdeu-se, surgindo nestas populações uma maior susceptibilidade para o desenvolvimento da obesidade e da resistência à insulina.

Um dos principais candidatos a gene de poupança é o gene PPAR- $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$* ) que é expresso em vários tecidos e em várias isoformas, sendo a isoforma  $\gamma$ -2 a predominante no tecido adiposo (Staels *et al.*, 2005). Este gene codifica um factor de transcrição nuclear, que é activado por ácidos gordos, e que estimula a expressão de genes responsáveis pela diferenciação dos adipócitos promovendo desta forma o armazenamento de triglicéridos e glucose nos adipócitos. A estimulação dos PPAR $\gamma$  altera a transcrição de vários genes que são também sensíveis à insulina, nomeadamente o lipoproteína lipase, a proteína transportadora de ácidos gordos, glucocinase, fosfoenol-piruvato carboxicinase, e GLUT-4 (Kramer *et al.*, 2001; Staels *et al.*, 2005). As mutações com perda de função do gene PPAR $\gamma$ -2 originam uma síndrome de lipodistrofia parcial com perda de massa adiposa e resistência à insulina. A administração de ligandos sintéticos para o PPAR $\gamma$  promove a diferenciação dos adipócitos e a captação de AGL pelo tecido adiposo subcutâneo, por oposição ao tecido visceral. Estes ligandos melhoram a sensibilidade à insulina, uma vez que diminuem a competição dos AGL para a glucose como substrato energético, facilitando a utilização desta última (Staels *et al.*, 2005). Os agonistas dos PPAR $\gamma$  possuem ainda efeitos anti-inflamatórios, diminuindo os níveis de citocinas produzidas pelos adipócitos tais como o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a resistina, o que aumenta a sensibilidade à insulina (Cabrero *et al.*, 2002).

### **1.3.2 Proteína cinase activada pelo AMP**

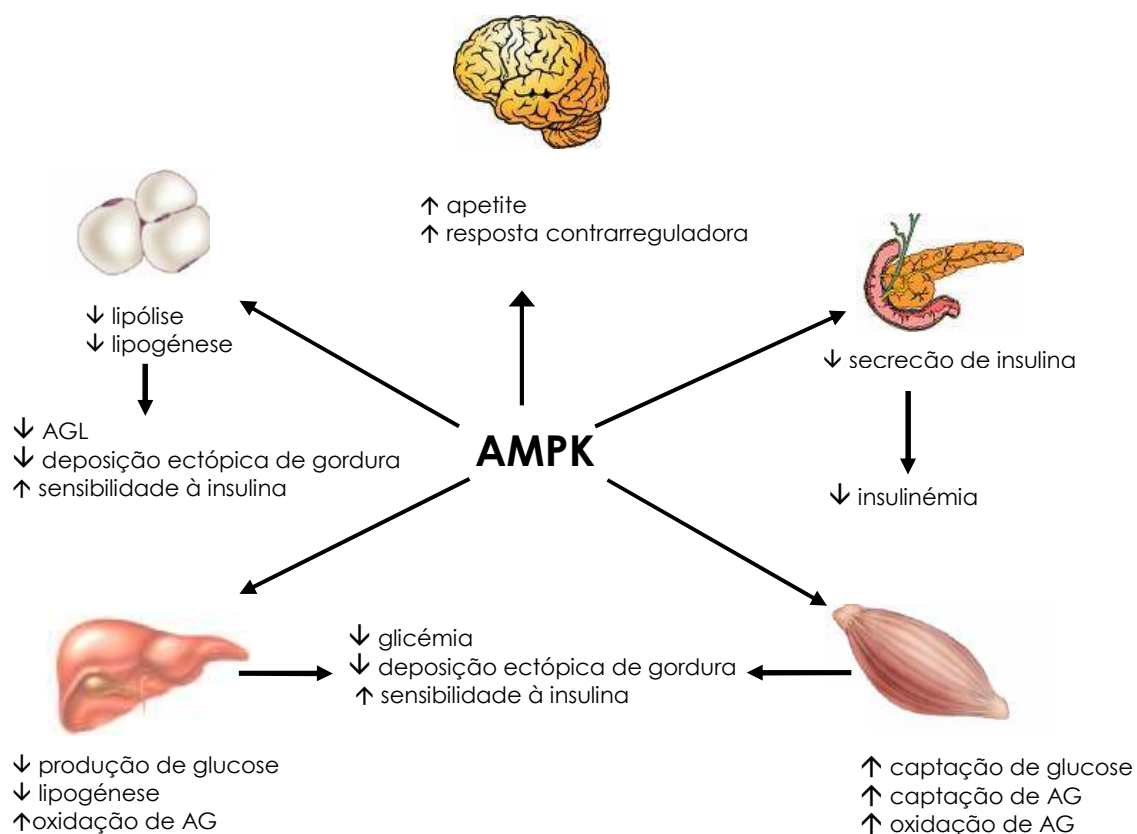
O proteína cinase activada pelo AMP foi recentemente proposto como sendo um sensor de energia que regula o metabolismo celular (Hardie *et al.*, 1998). O AMPK é um serina-treonina cinase, de natureza ubiquitária, que é activado pelo AMP em resposta a factores de *stress* ambiental, ou nutricional, que depletam os níveis intracelulares de ATP, tais como o jejum, choque térmico, hipóxia, hipoglicémia e exercício prolongado (Long

*et al.*, 2006). O resultado da activação do AMPK é a inibição das vias anabólicas, que consomem energia, nomeadamente a síntese de ácidos gordos e de esteróides e activação de vias catabólicas produtoras de ATP, tais como a  $\beta$ -oxidação (Long *et al.*, 2006). Assim, sabe-se que o jejum resulta num aumento da actividade do AMPK em várias áreas hipotalâmicas enquanto que a ingestão de alimentos inibe a actividade do enzima (Minokoshi *et al.*, 2004). A activação do AMPK no hipotálamo está associada a um aumento da expressão do RNA mensageiro (RNAm) de péptidos orexigénicos tais como o neuropeptído Y e o *agouti-related peptide* (Minokoshi *et al.*, 2004), conduzindo a um aumento do apetite. Por outro lado, as hormonas anorexigénicas, insulina e leptina, e a elevação dos níveis plasmáticos de glucose inibem a actividade hipotalâmica do AMPK (Minokoshi *et al.*, 2004). Moléculas orexigénicas tais como os canabinóides ou a grelina estimulam a actividade hipotalâmica do AMPK (Andersson *et al.*, 2004; Kola *et al.*, 2005). Estas observações sugerem que o AMPK hipotalâmico integra a informação proveniente de sinais hormonais e dos nutrientes circulantes, coordenando as vias orexigénicas e anorexigénicas de forma a regular o apetite, a ingestão de alimentos e o peso corporal.

Nos tecidos periféricos, o AMPK regula uma panóplia de vias metabólicas com o intuito de estimular as vias catabólicas que levam à produção de ATP. Constatou-se que a administração de AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamida ribosido), um análogo da adenosina que é convertido intracelularmente a AMP conduzindo à activação do AMPK, leva a um aumento da captação de glucose pelo músculo esquelético (Hayashi *et al.*, 1998; Wojtaszewski *et al.*, 2002), bem como a um aumento da oxidação de ácidos gordos (Merrill *et al.*, 1997). Para além disto, o AICAR reduz a síntese de triglicéridos e a lipólise nos adipócitos o que sugere que a activação do AMPK tem efeitos pleiotrópicos na manutenção da homeostasia (Bergeron *et al.*, 2001). As vias de transdução de sinal activadas pelo AMPK permanecem em estudo, tendo sido propostos vários mecanismos através dos quais o AMPK actua (Long *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2006). Particularmente relevante é a observação de que o AMPK tem capacidade de fosforilar o eNOS, e assim

regular a sua actividade através de uma modificação covalente (Chen *et al.*, 1999). Vários grupos têm reportado que a activação do AMPK no músculo esquelético pode estar relacionada com o aumento da captação de glucose dependente do NO, induzida pelo exercício físico (Hutber *et al.*, 1997; Musi *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2003), no entanto o mecanismo permanece por esclarecer. É importante realçar que, apesar de algumas das acções do AMPK surgirem indubitavelmente associadas à produção de NO, outras parecem ser totalmente independentes da sua síntese. Shearer *et al.* publicaram recentemente um trabalho em que demonstram que o AMPK conduz a um aumento da captação de glucose no músculo esquelético que é dependente da integridade da via do NO, enquanto que a captação de ácidos gordos induzida pela activação do AMPK neste tecido não depende da activação do NOS (Shearer *et al.*, 2004). Outros mecanismos têm sido propostos para o papel do AMPK na potenciação da acção da insulina. Recentemente Burcelin *et al.* sugeriram a existência de um sensor hepatoportal de glucose, cuja activação conduz a um reflexo neuronal que leva a um aumento da captação de glucose no músculo esquelético, miocárdio e tecido adiposo castanho, independentemente da acção da insulina, e que requer a activação do AMPK (Burcelin *et al.*, 2003).

Pelo seu papel preponderante na homeostasia da glucose e pela sua acção em tecidos alvo da insulina como o músculo esquelético, tecido adiposo e fígado (figura 1.4), alterações na via de sinalização do AMPK têm sido propostas como possível mecanismo etiopatogénico da resistência à insulina (Viollet *et al.*, 2003).



**Figura 1.4:** Papel da proteína cinase activada pelo AMP (AMPK) na regulação da homeostasia da glucose. A activação do AMPK despoleta processos que conduzem à formação de ATP. No músculo esquelético, a activação aguda do AMPK promove a captação de glucose e de ácidos gordos (AG) bem como a oxidação destes últimos. No fígado, a activação do AMPK inibe a gluconeogénese e a glicogenólise bem como a lipogénese, enquanto que a oxidação de lípidos aumenta. A lipólise e a lipogénese diminuem no tecido adiposo após a estimulação do AMPK. Em conjunto, a activação do AMPK nos vários órgãos resulta numa diminuição da glicémia, redução dos AG circulantes, redução da acumulação ectópica de gordura e aumento da sensibilidade à insulina. A activação do AMPK pancreático está associada a uma diminuição da produção de insulina. No sistema nervoso central, a activação do AMPK hipotalâmico aumenta o apetite e potencia a resposta das hormonas contra-reguladoras. Adaptado de (Long *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2006)

### 1.3.3 Stress oxidativo

O *stress oxidativo*, ou o efeito deletério induzido por espécies reactivas de oxigénio nos sistemas biológicos, está reconhecidamente envolvido na patogénese das complicações da diabetes tipo 2 (Brownlee, 2005). Foi proposta por Stern em 1995, e recentemente revista por Ceriello, uma hipótese conhecida como "The common soil hypothesis", que sugere que o estilo de vida sedentário e os excessos nutricionais conduzem a uma sobrecarga de glucose e ácidos gordos livres no plasma, que levam a uma superprodução de radicais livres (Ceriello *et al.*, 2004). Este aumento na produção de espécies radicalares está intimamente associado à etiologia da doença, sendo responsável pela insulinoresistência no músculo e no tecido adiposo, pelas alterações na secreção da insulina na célula  $\beta$  pancreática, e pela diminuição dos níveis de glutathione (GSH) característicos da diabetes tipo 2 (Ceriello, 1997; Ceriello *et al.*, 2004; Opara, 2004).

Embora o papel do *stress oxidativo* nas complicações crónicas da diabetes tipo 2 seja unanimemente aceite, a teoria unificadora dos radicais livres está longe de ser consensual. Para esta controvérsia muito contribuíram observações inconsistentes relativas à administração de diferentes tipos de antioxidantes a doentes diabéticos: por um lado, verificou-se que a administração crónica de vitaminas C e E não trazia qualquer benefício metabólico aos doentes, embora diminuísse os marcadores plasmáticos de *stress oxidativo* (Yusuf *et al.*, 2000; Collins, 2002); por outro lado observou-se que a perfusão do antioxidante GSH promoveu um aumento significativo da captação de glucose dependente da insulina nos indivíduos diabéticos (Paolisso *et al.*, 1992a; Paolisso *et al.*, 1992b; De Mattia *et al.*, 1998). Estes resultados pareciam indicar que o mecanismo de acção do GSH no metabolismo da glucose era substancialmente diferente do de outros antioxidantes, parecendo não estar directamente relacionado com as suas propriedades de neutralizador de radicais livres. Esta hipótese foi ainda suportada pela observação de que o padrão do metabolismo hepático do GSH em ratos diabéticos, embora alterado, era totalmente distinto do tipicamente observado após aumento do

*stress* oxidativo, por exemplo com t-butil-hidroperóxido ou administração crónica de etanol (McLennan *et al.*, 1991).

Apesar destas observações, é consensual que na diabetes ocorre um aumento da produção de radicais livres pelas mitocôndrias, associado a um aumento do fluxo de ácidos gordos livres e de glucose e, conseqüentemente, a um aumento do *stress* oxidativo (Bloch-Damti *et al.*, 2005). Estudos realizados em culturas primárias de músculo e adipócitos de doentes diabéticos revelaram alterações na expressão proteica e na activação de vários cinases intimamente ligados à resposta ao *stress* oxidativo (Evans *et al.*, 2005). Um grupo importante de cinases que se encontram sobre-expressos nos diabéticos é o grupo dos cinases de resposta ao *stress*, também designados por MAPK. Esta família é constituída por três grupos de cinases de resíduos de serina/treonina estruturalmente relacionadas, nomeadamente os cinases-regulados extracelularmente 1 e 2 (ERK 1/2), os cinases N-terminal do c-jun (JNK) e os p38 MAPK (Bloch-Damti *et al.*, 2005). A activação crónica dos MAPK pelos radicais livres tem sido associada à resistência à insulina tanto em adipócitos (Rudich *et al.*, 1999) como em miócitos (Maddux *et al.*, 2001), uma vez que é acompanhada por uma inibição das vias metabólicas induzidas pela insulina. Para além disso está também descrito que um aumento da produção de radicais livres diminui a transcrição do gene do transportador GLUT-4 (Khamaisi *et al.*, 2000; Carlson *et al.*, 2003). Recentemente constatou-se que a via do factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) está também envolvida na resistência à insulina que se observa nos adipócitos expostos a condições de elevado *stress* oxidativo (Ogihara *et al.*, 2004). O NF $\kappa$ B é um factor de transcrição que existe num estado inactivo no citosol onde se encontra ligado a membros da família de proteínas inibitórias I $\kappa$ B. Na presença de citocinas e espécies radicalares de oxigénio a I $\kappa$ B é fosforilada pelo cinase do I $\kappa$ B (IKK) e degradada no proteossoma, permitindo a translocação do NF $\kappa$ B livre para o núcleo (Bogdan, 2001). Ogihara *et al.* observaram que a activação da via do NF $\kappa$ B conduziu a uma diminuição da fosforilação do IRS-1 induzida pela insulina, diminuição da actividade da PI3K e



diminuição da expressão dos GLUT-4 em adipócitos (Ogihara *et al.*, 2004). O aumento do stress oxidativo é actualmente aceite como um importante factor causal na etiologia da resistência à insulina.

#### **1.3.4 Gradiente hepato-portal**

A insulina promove normalmente a captação de glucose pelo fígado em situações de hiperglicémia. No entanto observou-se que a captação de glucose hepática é muito mais eficaz quando a glucose é administrada por via oral do que por via intravenosa, em que são necessárias concentrações muito elevadas quer de glucose ( $> 200$  mg/dl), quer de insulina ( $> 600$  pmol/l) para atingir valores fisiológicos de captação de glucose hepática (Adkins *et al.*, 1987; Pagliassotti *et al.*, 1992; Stumpel *et al.*, 1998). A discrepância observada entre a captação de glucose hepática durante uma perfusão intravenosa de glucose *versus* ingestão de glucose foi inicialmente atribuída a um efeito das incretinas, associado à administração de glucose *per os* (DeFronzo *et al.*, 1978; Creutzfeldt, 1979; Ferrannini *et al.*, 1990). No entanto, vários laboratórios demonstraram posteriormente que a perfusão intraportal de glucose mimetiza os resultados obtidos com a administração oral de glucose (Bergman *et al.*, 1982; Ishida *et al.*, 1983), incluindo quando se inibe a secreção do pâncreas endócrino com somatostatina (Adkins *et al.*, 1987). Este aumento da captação de glucose hepática através da administração intraportal de glucose, por comparação com a administração periférica foi designado de "sinal portal" (Gardemann *et al.*, 1986; Adkins *et al.*, 1987).

Para além dos seus efeitos hepáticos, o sinal portal afecta também outros tecidos, nomeadamente estimula a secreção pancreática de insulina e suprime a captação de glucose pelo músculo esquelético, permitindo repor rapidamente as reservas de glicogénio hepáticas (Pagliassotti *et al.*, 1996). O sinal portal parece ser mediado pelo SNC, uma vez que tanto a desnervação hepática como a secção selectiva do ramo

hepático do nervo esplâncnico bloqueiam o aumento da captação de glucose hepática observado após administração intraportal de glucose (Adkins-Marshall *et al.*, 1992). Recentemente Burcelin *et al.* observaram que murganhos aos quais foi administrada uma perfusão intraportal de glucose a uma velocidade equivalente à produção endógena de glucose, desenvolveram hipoglicémia devido a uma aparente estimulação da captação periférica de glucose no tecido adiposo castanho e no miocárdio (Burcelin *et al.*, 2000). Estas observações contradizem a hipótese do sinal portal, segundo a qual a perfusão de glucose na veia porta de cães ou no duodeno de humanos, a uma velocidade semelhante à da produção endógena de glucose, resultou numa ligeira hiperglicémia e não hipoglicémia. Esta disparidade de resultados foi justificada com as diferenças inter-espécies na captação de glucose pelos tecidos, uma vez que no cão e no humano o miocárdio e o tecido adiposo castanho não constituem locais significativos de captação de glucose (Ashwell *et al.*, 1987; Young *et al.*, 1997a). Permanece por esclarecer a relevância fisiológica do sinal portal na espécie humana e ainda se alterações neste mecanismo poderão estar envolvidas na patogénese da resistência à insulina.

### **1.3.5 Hipótese vascular**

Apesar de ser consensual que a insulina estimula a translocação dos transportadores de glucose GLUT-4 para a membrana plasmática dos tecidos alvo mantém-se em aberto a questão de se um aumento no número de GLUT-4 translocados por acção da insulina é ou não acompanhado por um aumento na captação de glucose para o músculo *in vivo*. Foi sugerido por vários autores que, à medida que a insulinémia e a permeabilidade das membranas à glucose aumenta, aumenta também o aporte vascular de glucose aos tecidos alvo da insulina (Baron *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1995). O trabalho realizado por estes grupos sugere que, fisiologicamente, a insulina recruta capilares de forma a

aumentar o aporte de sangue ao músculo e, conseqüentemente, de glucose, otimizando assim a captação de glucose na presença de concentrações elevadas de insulina. Foi proposto por Baron *et al.* que alterações no efeito vasodilatador da insulina poderiam estar envolvidas na patogénese da resistência à insulina, no entanto observou-se que o aumento do fluxo sanguíneo induzido pela administração de nitroprussiato de sódio não incrementou a sensibilidade à insulina (Pitkanen *et al.*, 1999). A hipótese vascular da etiopatogenia da resistência à insulina tem ainda sido contestada por outros autores que argumentam que o efeito vasodilatador da insulina só é significativo para concentrações de insulina supra-fisiológicas, sendo que as adaptações vasculares promovidas por concentrações fisiológicas desta hormona não são relevantes (Scherrer *et al.*, 1994; Porter *et al.*, 1997; Natali *et al.*, 1998).

#### **1.3.6 Hipótese adipocêntrica**

O tecido adiposo constitui um importante órgão endócrino, responsável pela secreção de inúmeras substâncias que interagem com o metabolismo glicídico e lipídico, condicionando a sensibilidade dos tecidos à acção da insulina. Um aumento da massa de tecido adiposo conduz impreterivelmente a um aumento da concentração de AGL no plasma. Embora os AGL sejam nutrientes importantes, nomeadamente por serem o substrato oxidativo mais relevante para o coração e músculo esquelético em repouso, resultados obtidos por vários grupos apontam para que os AGL possam estar directamente envolvidos na etiologia da resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2 (Mora *et al.*, 2002; Cederberg *et al.*, 2003).

Em 1963 foi postulado por Randle que a elevação de AGL circulantes conduz a uma diminuição da captação de glucose pelo tecido muscular, levando à introdução do termo "Ciclo de Randle" para descrever a competição entre a glucose e os AGL como substrato para obtenção de energia.

De acordo com esta hipótese, o aumento da  $\beta$ -oxidação causa uma elevação na razão acetil CoA/CoA mitocondrial, aumentando a concentração de citrato e resultando na inibição do fosfofrutocinase, com subsequente acumulação de G6-P. Este metabolito inibe a hexocinase, diminuindo assim a captação de glucose extracelular (Randle *et al.*, 1963).

Outros mecanismos têm sido propostos para explicar a acção deletéria dos AGL na captação de glucose, nomeadamente através da interferência de metabolitos intracelulares dos AGL, tais como o DAG ou as ceramidas, na cascata de sinalização da insulina (Kovacs *et al.*, 2005). Foi sugerido que estes mediadores inibem a actividade do  $PI_3K$  (Dresner *et al.*, 1999) e também que a activação da via das hexosaminas (Hawkins *et al.*, 1997) e de proteínas tirosinas fosfatases (Goldstein *et al.*, 1998) está envolvida na resistência à insulina induzida pelos AGL.

Mais recentemente foi sugerida uma hipótese alternativa para a resistência à insulina associada à obesidade. O tecido adiposo, como órgão endócrino que é, secreta várias substâncias conhecidas como adipocinas (Trayhurn *et al.*, 2004). Dentro do conjunto de adipocinas conhecidas destacam-se algumas citocinas inflamatórias tais como a interleucina-6, a interleucina-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  (Kobayashi, 2005). Estas citocinas têm uma acção pró-inflamatória e, actuando a nível hepático, induzem a libertação de proteínas de fase aguda como a proteína C reactiva. Estes mediadores, para além de serem marcadores clínicos de um processo inflamatório, têm um papel activo na perpetuação desse processo reduzindo a sensibilidade à insulina através da inibição da actividade de tirosina cinase do receptor da insulina e diminuição da expressão do gene que codifica para os GLUT-4 (Hotamisligil, 1999a; Hotamisligil, 1999b; Rotter *et al.*, 2003). Vários estudos epidemiológicos sugerem que os marcadores de inflamação sub-clínica podem ser preditivos para o desenvolvimento da resistência à insulina e da diabetes tipo 2 (Leyva *et al.*, 1998; Haffner, 2003; Godsland *et al.*, 2004).

## 1.4 METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À INSULINA IN VIVO

A resistência à insulina é um fenómeno de reconhecida importância na patogénese da diabetes *mellitus* tipo 2, encontrando-se ainda associada a diversas patologias tais como a obesidade, hipertensão arterial, síndrome metabólica e síndrome de apneia obstrutiva do sono. A avaliação da sensibilidade à insulina tem pois um elevado interesse tanto num cenário de investigação científica como na prática clínica. As metodologias existentes para avaliar a sensibilidade à insulina podem ser agrupadas em dois grandes conjuntos, as metodologias dinâmicas e as metodologias realizadas em condições basais. As técnicas de maior rigor são as que recorrem a uma intervenção dinâmica, como por exemplo a perfusão de glucose e/ou insulina. As técnicas realizadas em condições basais decorrem da determinação das insulinémias e glicémias após jejum nocturno, valores estes que podem ser correlacionados e que permitem o cálculo de um índice de sensibilidade à insulina.

### 1.4.1 Metodologias de avaliação da sensibilidade à insulina realizadas em condições basais

Destacam-se a razão glicémia em jejum ( $G_0$ ) /insulinémia em jejum ( $I_0$ ) e alguns índices de resistência à insulina, nomeadamente o índice HOMA ("homeostasis model assessment"), definido pela equação:

$$\text{HOMA} = I_0 (\mu\text{UI/ml}) / [22.5 \times e^{-\ln G_0 (\text{mmol/l})}]$$

o índice FIRI ("fasting insulin resistance Index"), definido pela equação:

$$\text{FIRI} = [I_0 (\mu\text{UI/ml}) \times G_0 (\text{mmol/l})] / 25$$

e o índice de sensibilidade à insulina QUICKI ("quantitative insulin sensitivity check Index"), definido pela equação:

$$\text{QUICKI} = 1 / [\log I_0 (\mu\text{UI/ml}) + \log G_0 (\text{mg/dL})]$$

Estes índices são de fácil determinação e elevada reprodutibilidade, apresentando no entanto algumas limitações. Para além de se basearem apenas num valor de insulinémia (pelo que os resultados dependem da precisão da medida e também da técnica utilizada), fornecem pouca informação sobre o efeito da insulina nos tecidos periféricos, nomeadamente no músculo esquelético e no tecido adiposo (Monzillo *et al.*, 2003). Mais ainda, têm a desvantagem de não poderem ser aplicados em indivíduos com deficiente secreção de insulina (como é o caso dos diabéticos), uma vez que a hipoinsulinémia resultante da disfunção da célula  $\beta$  introduz um artefacto no cálculo dos índices supra-mencionados (Monzillo *et al.*, 2003) e de só estarem validados para avaliar a acção da insulina no estado de jejum (Monzillo *et al.*, 2003).

#### **1.4.2 Metodologias de avaliação da sensibilidade à insulina com intervenção dinâmica**

##### **1.4.2.1 Prova de tolerância à glucose oral (PTGO)**

A prova de tolerância à glucose oral (PTGO) constitui o método de avaliação da tolerância diminuída à glucose mais utilizado na prática clínica. Na PTGO é administrada uma quantidade fixa de glucose por via oral e a glicémia e insulinémia são medidas ao longo de 2 h. Embora muito utilizada para o diagnóstico da diabetes *mellitus*, representa uma medida indirecta da sensibilidade à insulina, uma vez que a PTGO mede apenas a

eficiência com que os mecanismos de homeostasia repõem a glicémia em valores basais após uma perturbação (Radziuk, 2000). A quantificação da sensibilidade à insulina envolve a medição da cinética da glicémia e insulinémia plasmáticas em resposta à administração oral de glucose. Numa situação fisiológica, ocorre um aumento na insulinémia proporcional ao aumento na glicémia. Se houver uma diminuição na secreção de insulina, ocorre tolerância diminuída à glucose, mas não se pode concluir se existem ou não alterações na sensibilidade à insulina uma vez que a secreção da hormona está diminuída. Só quando se observa hiperinsulinémia concomitante com tolerância normal ou diminuída à glucose se pode concluir que existe resistência à insulina (Bergman *et al.*, 1985).

#### **1.4.2.2 Clamp euglicémico hiperinsulinémico (HIEC)**

O clamp euglicémico hiperinsulinémico (HIEC) é considerado a técnica de referência, ou "gold-standard", na avaliação da sensibilidade à insulina *in vivo*. Durante o HIEC, é administrada uma perfusão intravenosa constante de insulina exógena em simultâneo com uma perfusão variável de glucose. Assim, é induzida uma hiperinsulinémia durante a qual a glicémia é controlada dentro de valores considerados fisiológicos, até que se atinge um estado estacionário. A sensibilidade à insulina é calculada com base nas necessidades de glucose e nos níveis de insulinémia em condições de estado estacionário. Muitas vezes é também administrada somatostatina a fim de bloquear a secreção endógena de insulina e glucagina (DeFronzo *et al.*, 1979).

Apesar de ser encarado como o método de referência para avaliar a sensibilidade à insulina o HIEC apresenta algumas limitações, nomeadamente porque a infusão contínua de insulina prolonga-se por períodos superiores a 3 horas, o que pode introduzir artefactos nos resultados uma vez que se sabe que a libertação fisiológica de insulina pela célula  $\beta$  do pâncreas ocorre de forma pulsátil (Porksen *et al.*, 1995). Esta característica impossibilita

ainda a realização de mais do que um teste no mesmo dia (Paolisso *et al.*, 1988; Reid *et al.*, 2002; Reid *et al.*, 2004) e induz uma inibição do tónus vagal decorrente da hiperinsulinémia induzida pela técnica (Van De Borne *et al.*, 1999).

#### **1.4.2.3 Teste de tolerância à insulina (ITT)**

No teste de tolerância à insulina (ITT), é administrado um bólus intravenoso de insulina e a sensibilidade à acção desta hormona é medida pela velocidade de declínio das concentrações plasmáticas de glucose. Quanto mais acentuado for o decréscimo, maior será a sensibilidade à insulina. As vantagens do ITT incluem a sua simplicidade, rapidez, utilização de um bólus de insulina, por oposição a uma perfusão contínua, o que mimetiza a secreção fisiológica pulsátil da hormona e ainda o facto de poder ser realizado tanto no estado de jejum como no estado pós-prandial. Entre as desvantagens do ITT contam-se a hipoglicémia e activação da resposta hormonal contra-reguladora (Monzillo *et al.*, 2003).

#### **1.4.2.4 Teste rápido de sensibilidade à insulina (RIST)**

Recentemente foi descrito um novo método de avaliação da sensibilidade à insulina, designado por teste rápido de sensibilidade à insulina (RIST) (Lautt *et al.*, 1998a). Este método foi descrito pela primeira vez para uso em gatos e ratos (Xie *et al.*, 1996c) tendo sido introduzidas pequenas modificações nos últimos anos com o intuito de melhorar aspectos técnicos (Lautt *et al.*, 1998a) .

O teste consiste na realização de um "clamp" normoglicémico após a administração de um bólus de insulina durante 5 minutos. Este método de administração aproxima-se mais de uma situação fisiológica em que, após um aumento na glicémia, há libertação dinâmica de insulina (Lautt *et al.*, 1998a).



A sensibilidade à insulina é avaliada através da quantificação de glucose que é necessário perfundir durante o RIST, de forma a manter os níveis glicémicos arteriais constantes, sendo este parâmetro designado por RIST Index (Lautt *et al.*, 1998a). O teste deve ser realizado por um técnico experiente, uma vez que requer o ajuste manual da perfusão de glucose para manter a euglicémia, com base nas concentrações arteriais de glucose medidas a cada 2 min.

### **1.5 A HIPÓTESE DA SUBSTÂNCIA HEPÁTICA SENSIBILIZADORA DA INSULINA (HISS)**

Em 1980 Lautt publicou um trabalho pioneiro em que sugeriu pela primeira vez que a neuropatia parassimpática hepática poderia contribuir para a resistência à insulina que se observa na diabetes *mellitus* não insulino-dependente. Estudos realizados desde então levaram à formulação de uma nova hipótese de mecanismo neurohumoral, segundo o qual o fígado regula a resposta à insulina através da libertação de uma hormona à qual se chamou “Hepatic Insulin Sensitizing Substance” ou HISS (Xie *et al.*, 1995a)

Segundo a hipótese da HISS, no estado pós-prandial é desencadeado um reflexo parassimpático hepático que provoca a libertação de ACh nos terminais eferentes do ramo hepático do vago (Lautt, 1999). Esta, por sua vez, activa receptores muscarínicos do tipo M1 levando à libertação da HISS através de um mecanismo mediado pelo NO hepático (Sadri *et al.*, 1997). A HISS actua selectivamente no músculo esquelético, sendo responsável por cerca de 55 % da captação de glucose no estado pós-prandial (Lautt *et al.*, 2001).

A resistência à insulina que ocorre após desnervação do fígado foi pela primeira vez descrita em 1993. Os primeiros estudos que evidenciaram que a acção da insulina é modulada pelos nervos hepáticos mostraram que o nível de hipoglicémia induzido pela administração de insulina era atenuado após desnervação hepática (Xie *et al.*, 1993). Posteriormente observou-se que, tanto a administração intraportal de atropina, como a

desnervação selectiva dos nervos parassimpáticos hepáticos, produziam uma resistência à insulina com igual magnitude, o que permitiu concluir que os nervos envolvidos eram de natureza colinérgica (Xie *et al.*, 1995a). Estudos farmacológicos com os antagonistas muscarínicos pirenzepina (antagonista selectivo M1) e metoctramina (antagonista selectivo M2) determinaram o envolvimento dos receptores muscarínicos hepáticos do sub-tipo M1 na sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina (Xie *et al.*, 1995b).

Estes trabalhos permitiram concluir que a acção periférica da insulina depende de dois componentes, um que é independente dos nervos parassimpáticos hepáticos, outro que é dependente dos nervos parassimpáticos hepáticos e que é modulado pela libertação reflexa da HISS.

#### **1.5.1 A HISS é produzida no fígado**

De forma a determinar qual o órgão envolvido na resistência à insulina que se observa após o bloqueio dos nervos parassimpáticos hepáticos Xie *et al.* mediram os gradientes arterio-venosos de glucose nas patas traseiras (consideradas como representativas do músculo esquelético), no intestino e no fígado de gatos, na presença de insulina, após administração de atropina ou após desnervação parassimpática hepática. Estes autores mostraram que a captação de glucose no intestino e no fígado não se alterou na presença de atropina, após ablação do plexo anterior hepático ou após combinação de ambos, enquanto que a captação de glucose nas patas traseiras diminuiu em todas as situações mencionadas. Em função destes resultados, sugeriram que a resistência à insulina causada pelo bloqueio dos nervos parassimpático hepáticos ocorre no tecido muscular esquelético (Xie *et al.*, 1996b).

Posteriormente constatou-se que a resistência à insulina provocada por desnervação cirúrgica do fígado foi completamente revertida por perfusão de ACh na veia porta, enquanto que a administração na veia jugular da mesma dose de ACh não produziu

qualquer alteração na acção da insulina (Xie *et al.*, 1996a). Este efeito selectivo de administração intraportal *versus* intravenosa identificou o fígado como o órgão responsável pela resistência à insulina observada após desnervação, sugerindo ainda que a activação dos receptores muscarínicos hepáticos aumentou a sensibilidade à insulina através da libertação de um factor humoral para a corrente sanguínea, e não por estimulação de aferentes hepáticos, uma vez que a ACh intraportal restaurou a sensibilidade à insulina após desnervação cirúrgica do fígado.

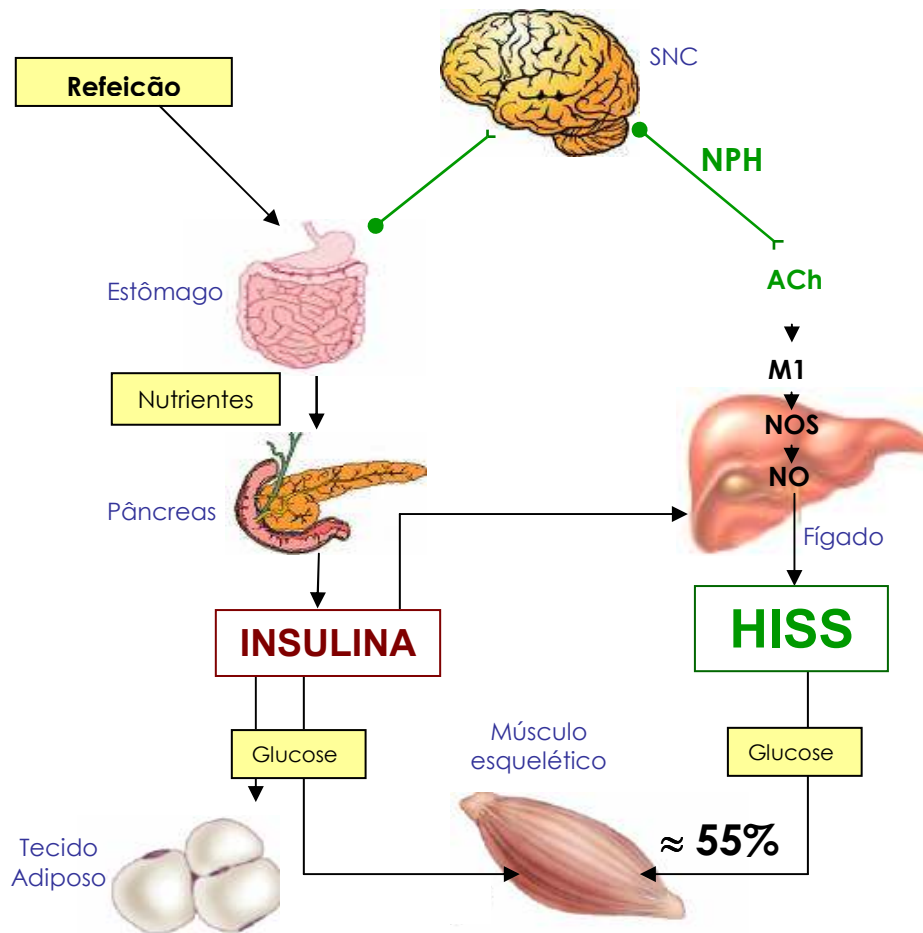
O mesmo autor observou que a infusão intraportal de ACh, em ratos com uma enervação parassimpática hepática intacta, não promoveu um aumento da sensibilidade à insulina concluindo que, na presença de um reflexo parassimpático hepático fisiológico, existe uma resposta máxima que não é potenciada pela administração adicional do neurotransmissor (Xie *et al.*, 1996b).

### **1.5.2 O papel do monóxido de azoto hepático**

Sadri *et al.* descreveram pela primeira vez em 1998 que a produção de NO no fígado está envolvida no reflexo parassimpático hepático que modula a acção periférica da insulina. Estes autores observaram que a administração intraportal do antagonista do NOS, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) resultou numa acentuada resistência à insulina, de magnitude semelhante à observada após administração de atropina ou desnervação cirúrgica do fígado, enquanto que a mesma dose de L-NAME, administrada por via intravenosa, não alterou significativamente o efeito hipoglicemiante da hormona (Sadri *et al.*, 1998).

Posteriormente, os mesmos autores reportaram que o dador de NO, 3-hidrocloreto de morfolinosidnonimina (SIN-1) reverteu a resistência à insulina produzida, quer pelo antagonismo do NOS, quer por desnervação cirúrgica, desde que administrado por via intraportal. Não se verificou a reversão da resistência à insulina com administração

intravenosa de SIN-1 (Sadri *et al.*, 1999). Os autores concluíram que o NO está envolvido no reflexo parassimpático hepático que leva à libertação da HISS e estabeleceram uma hipótese para o mecanismo que conduz à sua libertação, representado esquematicamente na figura 1.5.



**Figura 1.5:** Esquema da hipótese da HISS. A ingestão de uma refeição conduz à liberação de insulina pelo pâncreas e à promoção da captação de glucose dependente da insulina no tecido adiposo, músculo esquelético e fígado. Simultaneamente ocorre a sinalização ao sistema nervoso central (SNC) para activar os nervos parassimpáticos hepáticos (NPS), levando à libertação de acetilcolina (ACh) no fígado que, por sua vez activa os receptores muscarínicos do tipo M1 que activam o sintase do monóxido de azoto (NOS). O aumento da produção de monóxido de azoto (NO) hepático conduz à libertação de um factor humoral designado por HISS (substância hepática sensibilizadora da insulina) para a corrente sanguínea. A HISS actua exclusivamente no músculo esquelético, sendo responsável por cerca de 55 % da acção hipoglicemiante da insulina no organismo. Se a função parassimpática ou a produção de NO hepático estiverem diminuídas, a captação de glucose mediada pela insulina diminui em 55 % devido ao bloqueio da síntese da HISS após as refeições. Esta condição é designada por resistência à insulina dependente da HISS. Figura adaptada de (Xie *et al.*, 1995a; Lutt, 2004)

### 1.5.3 O efeito da HISS depende do estado prandial

Os estudos iniciais do efeito da ablação dos nervos parassimpáticos hepáticos na acção da insulina mostraram que, enquanto que alguns animais possuíam uma componente da acção da insulina fortemente dependente da HISS, outros apresentavam uma dependência da HISS pouco acentuada (Xie *et al.*, 1996b). Observou-se que animais com maior sensibilidade à insulina apresentavam maior redução da componente da HISS após desnervação, contrastando com animais com sensibilidade à insulina reduzida, em que o efeito da ablação dos nervos hepáticos na captação de glucose promovida pela insulina era mínimo, ou mesmo nulo, (Xie *et al.*, 1996b).

Lautt *et al.* demonstraram em 2001 que a elevada variabilidade da acção da insulina dependente da HISS estava relacionada com as horas de jejum dos animais em estudo, e que o controlo da resposta hipoglicemiante à insulina, por parte dos nervos parassimpáticos hepáticos, dependia directamente do estado prandial. Estes autores observaram que, no estado pós-prandial imediato, o mecanismo dependente da HISS conduziu a uma sensibilização máxima à insulina dos tecidos periféricos e que esta sensibilização diminuiu progressivamente em função do número de horas de jejum; por outro lado, a componente da acção da insulina independente dos nervos parassimpáticos hepáticos não variou com o estado prandial. A colocação de comida no estômago de ratos anestesiados e submetidos a um período de jejum restaurou parcialmente a resposta hipoglicemiante insulina, para valores próximos dos obtidos no estado pós-prandial, mimetizando a acção da HISS na potenciação da sensibilidade à insulina (Lautt *et al.*, 2001).

#### **1.5.4 Patologias associadas à resistência à insulina em que existe comprometimento da acção da HISS**

Está descrito que doentes com intolerância à glucose, mas sem uma condição diabética franca, têm neuropatias do sistema nervoso autónomo com maior preponderância para alterações no sistema parassimpático (Hosking *et al.*, 1978). Esta observação é consistente com o pressuposto de que a neuropatia parassimpática provoca resistência à insulina, enquanto que um estado de doença avançada conduz às polineuropatias. Embora a diabetes *mellitus* tipo 2 seja a face mais visível da resistência à insulina, esta surge associada a uma panóplia de doenças incluindo a obesidade, a síndrome metabólica, a intolerância à glucose, a hipertensão, doenças crónicas do fígado e dislipidémias (DeFronzo *et al.*, 1991; DeFronzo, 1997). Nas últimas décadas assistiu-se a um crescente interesse pelas patologias associadas à resistência à insulina, devido às proporções mundiais que estas doenças têm vindo a assumir.

Vários autores descreveram a correlação entre a hipertensão essencial e a alteração metabólica que constitui a resistência à insulina (Olsen *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2000; Wiggam *et al.*, 2000). Foi referido por McLaughlin e Reaven que esta está presente em cerca de 50 % dos doentes hipertensos o que, juntamente com todos os outros factos citados, torna esta patologia um protótipo de estudo para a resistência à insulina bastante interessante (McLaughlin *et al.*, 2000). Ribeiro *et al.* em 2001 demonstraram pela primeira vez que a libertação da HISS se encontra comprometida num modelo animal de hipertensão arterial, o rato espontaneamente hipertenso (SHR). Os autores observaram que, após bloqueio do sistema parassimpático hepático com atropina, os ratos SHR apresentaram uma diminuição da acção da HISS e um aumento da componente da acção da insulina independente da HISS, o que sugere que a insulinoresistência presente nos SHR é devida a uma diminuição da acção da HISS por disfunção do reflexo parassimpático hepático (Ribeiro *et al.*, 2001b; Ribeiro *et al.*, 2007).

A obesidade é uma doença associada a resistência à insulina (Mora *et al.*, 2002; Cederberg *et al.*, 2003), a uma diminuição do tónus parassimpático (Peterson *et al.*, 1988), a disfunções na síntese de NO (Morley *et al.*, 1996; Bohlen *et al.*, 2002) e a um aumento do stress oxidativo (Soltys *et al.*, 2001). Estudos recentes realizados num modelo animal de obesidade, o rato Zucker fa/fa, mostraram que a resistência à insulina observada nestes animais se deve parcialmente a uma diminuição da acção da HISS, embora a componente da acção da insulina independente dos nervos parassimpáticos hepáticos também se encontre diminuída (Ribeiro *et al.*, 2001a).

A componente da acção da insulina dependente da HISS também se encontra diminuída num modelo animal de resistência á insulina, o rato submetido a uma dieta enriquecida com 35 % de sacarose (HSuR) (Ribeiro *et al.*, 2005). Ribeiro *et al.* mostraram que a sensibilidade à insulina dos HSuR foi significativamente inferior à dos ratos do grupo controlo, confirmando que dieta rica em sacarose induz resistência à insulina. Após atropinização, a acção da insulina independente da HISS foi semelhante nos dois grupos, mostrando que a resistência à insulina observada nestes animais se devia exclusivamente a um comprometimento da acção da HISS.

Outros autores verificaram ainda que a acção da HISS se encontra diminuída em modelos animais de insuficiência hepática, tais como o rato com exposição pré-natal ao etanol ou o rato com ligação crónica do ducto biliar (Lautt *et al.*, 1998b; Sadri *et al.*, 2005).

Com base nestes estudos prévios, surge a hipótese de que a resistência à insulina que se observa em doenças tais como a diabetes tipo 2, obesidade, hipertensão e síndrome metabólica pode resultar de alterações na acção da HISS, pelo que se torna pertinente estudar os seus aspectos bioquímicos, fisiológicos e fisiopatológicos.

Neste ponto parece-nos relevante realçar a importância do estudo dos mecanismos subjacentes à resistência à insulina, mais evidente quando consideramos o contexto



socio-económico dos dias de hoje. A incidência de doenças metabólicas tem assumido nas últimas décadas proporções epidémicas, constituindo uma séria ameaça à saúde humana. A resistência à insulina e tolerância diminuída à glucose atingem hoje cerca de 1 em cada 4 indivíduos com mais de 20 anos nas sociedades ocidentais. Preocupante é também o facto de os jovens adolescentes e as crianças serem cada vez mais vulneráveis à diabetes tipo 2, uma patologia que se considerava ser exclusiva da idade adulta. A maioria dos fármacos actualmente disponíveis no mercado para a terapêutica da diabetes tipo 2 foi desenhada em função dos seus sintomas, possuindo efeitos secundários consideráveis, o que limita a adesão à terapêutica, e uma eficácia limitada uma vez que visam essencialmente o controlo do peso corporal e dos níveis glicémicos a médio e longo prazo. Na procura de novos fármacos para esta doença, torna-se crucial perceber os mecanismos fisiopatológicos que lhe estão associados, nomeadamente os mecanismos da resistência periférica à insulina, com o intuito de prevenir o seu aparecimento numa fase precoce.

O trabalho apresentado nesta dissertação surge, neste contexto, enquadrado numa série de estudos realizados no laboratório da Professora Doutora Maria Paula Macedo sobre o papel da HISS na etiologia da resistência à insulina, e das patologias do foro metabólico que dela derivam. Os resultados obtidos sugerem um desvio de paradigma nos mecanismos reguladores da acção periférica da insulina, indicando ainda potenciais abordagens farmacológicas, alternativas às actualmente existentes, na terapêutica da resistência à insulina.

## 2. HIPÓTESES E OBJECTIVOS

O objectivo geral deste trabalho consistiu na caracterização da via de sinalização hepática que conduz à libertação da HISS pelo fígado, e que regula a sensibilidade periférica à insulina. Pretendeu-se caracterizar em termos bioquímicos e fisiológicos a cascata de mediadores envolvidos na síntese da HISS, tendo sempre presente a sua potencial manipulação farmacológica e possíveis implicações na saúde pública. A longo prazo, a caracterização da via de sinalização da HISS poderá contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para patologias caracterizadas pela resistência à insulina, tais como a hipertensão, obesidade ou diabetes tipo 2.

Especificamente, houve quatro objectivos: o primeiro consistiu em determinar o envolvimento da via de sinalização ACh/ NO/ 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) na secreção da HISS pelo fígado, nomeadamente a sequência de eventos que conduzem à sua libertação; o segundo consistiu no estudo da modulação da sensibilidade à insulina pelo glutatióno hepático; o terceiro consistiu na análise do efeito da co-administração de dadores de GSH e dadores de NO na sensibilidade à insulina e, por último, o quarto objectivo específico relacionou-se com o estudo do papel dos S-nitrosotióis na potenciação da acção hipoglicemiante da insulina.

O **primeiro objectivo específico** do trabalho foi estudar qual o efector envolvido na síntese/secreção da HISS que é activado pela ligação de ACh aos seus receptores no fígado. Na via de sinalização clássica, a ACh estimula a produção de NO que, por sua vez, activa o guanilato ciclase solúvel, levando à produção do segundo mensageiro GMPc (Ignarro, 1992). Este mecanismo de sinalização poderá estar envolvida na libertação da HISS, que se sabe ser dependente da produção de NO no fígado (Sadri *et al.*, 1997; Sadri *et al.*, 1998; Sadri *et al.*, 1999). No entanto, em determinados sistemas biológicos, nomeadamente o sistema nervoso central (Leonard *et al.*, 1997) e o sistema

nervoso entérico (Smith *et al.*, 1998) o NO modula a libertação de ACh pelos terminais colinérgicos (Garthwaite *et al.*, 1995), sendo a activação do NOS, um passo a montante da activação parassimpática. Torna-se assim pertinente esclarecer a sequência de eventos moleculares que conduzem à libertação da HISS. Os estudos desenvolvidos foram baseados nas seguintes **hipóteses**:

- A ACh promove a libertação de NO que por sua vez induz a libertação da HISS
- O NO promove a libertação da HISS por uma via modulada pelo guanilato ciclase.

O **segundo objectivo específico** deste trabalho foi o de esclarecer o mecanismo de regulação da secreção da HISS pelo GSH hepático. Estudos prévios demonstraram que a secreção da HISS se encontra inibida no estado de jejum, sendo máxima no estado pós prandial (Lautt *et al.*, 2001). Os níveis de NO e GSH hepáticos apresentam também o mesmo tipo de variação condicionada pelo estado prandial, o que sugere que a acção da HISS depende da existência de níveis elevados de GSH e NO no fígado. Foram assim testadas as seguintes **hipóteses**:

- A depleção de GSH hepático inibe a síntese da HISS conduzindo assim a resistência à insulina.
- O GSH, juntamente com o NO hepático, é essencial para a acção da insulina dependente da HISS.

O **terceiro objectivo específico** foi estudar o efeito da co-administração de dadores de GSH e dadores de NO na sensibilidade à insulina, com base nas seguintes **hipóteses**:

- a co-administração de dadores de GSH e de NO mimetiza o sinal prandial para a síntese hepática da HISS, aumentando assim a sensibilidade à insulina.
- o aumento na sensibilidade à insulina é dependente da dose de GSH administrada.

O **quarto objectivo específico** do trabalho partiu da premissa de que é necessária a presença simultânea de GSH e NO para aumentar a sensibilidade à insulina. Sabendo que o GSH e o NO reagem para formar um S-nitrosotiol, o S-nitrosoglutathione (GSNO), testou-se então a **hipótese** de que:

- a administração de S-nitrosotóis aumenta a sensibilidade à insulina através do mecanismo da HISS, em contraste com doadores de NO não-nitrosotóis que não alteram a sensibilidade à insulina.

### **3. METODOLOGIAS**

#### **3.1. ANIMAIS**

Utilizaram-se ratos Wistar machos, de 8-9 semanas de idade, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa com peso de  $318.8 \pm 4.3$  g e da Charles-River, Espanha, com peso de  $304.1 \pm 5.1$  g. Os animais estiveram sujeitos a condições controladas de acondicionamento (ciclo de luz de 12 h em 12 h; temperatura e humidade ambientes controladas) e foram alimentados com ração standard (Panlab A04 ou Lillyco RM1) com livre acesso a água.

Todos os procedimentos foram efectuados de acordo com as normas comunitárias relativas à experimentação animal (Directiva 86/609/EC) e nos termos da legislação portuguesa (Decreto de lei n.º 1005/92). Os animais permaneceram anestesiados durante toda a experiência, procedendo-se à eutanásia com uma injeção letal de pentobarbital sódico, em conformidade com a legislação supra-mencionada.

#### **3.2. PROCEDIMENTO PRÉ-CIRÚRGICO**

No dia anterior à cirurgia os animais foram submetidos a um jejum de 24 h. Sempre que o protocolo experimental o requeria, o período de jejum foi seguido de 1 hora de alimentação *ad libitum*, de forma a maximizar a acção da HISS. Todas as experiências começaram entre as 9:00 e as 10:00h.

A metodologia adoptada foi a descrita por Lautt *et al.* em 1998. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com pentobarbital sódico (65 mg/kg). O pentobarbital sódico foi o fármaco utilizado uma vez que induz a anestesia sem ter efeitos marcados na actividade do sistema nervoso autónomo (Best *et al.*, 1984; Taborsky *et al.*, 1984), na hemodinâmica esplâncnica (Kvietys *et al.*, 1982) e na absorção de nutrientes

(Yuasa *et al.*, 1993), minimizando assim a introdução de artefactos na avaliação da sensibilidade à insulina (Penicaud *et al.*, 1987).

A opção pelo pentobarbital prendeu-se ainda com o facto de ter sido demonstrado que a sensibilidade à insulina dependente da HISS não sofre alterações após anestesia com este fármaco (Latour *et al.*, 2002). Os mesmos autores observaram que, tanto a regulação fisiológica, como a manipulação farmacológica da acção da HISS não apresentavam diferenças nos ratos anestesiados com pentobarbital comparativamente a animais conscientes.

### **3.3. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**

O procedimento cirúrgico consistiu em efectuar uma traqueostomia, seguida da montagem de um circuito vascular extra corporal para a recolha de amostras de sangue arterial e para a perfusão sistémica de fármacos, na veia jugular. Sempre que o protocolo incluía administrações intraportais de substâncias, cateterizou-se a veia porta.

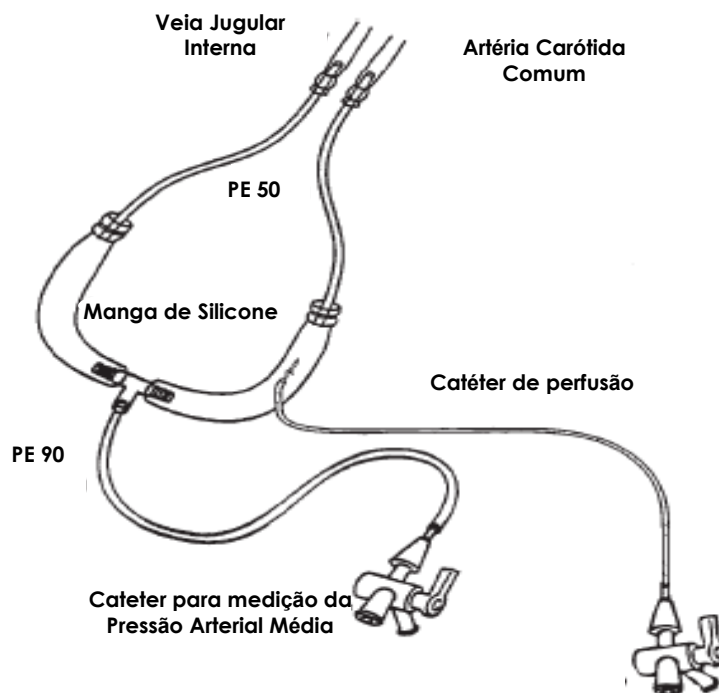
#### **3.3.1. Traqueostomia**

Foi realizada uma traqueostomia, de forma a manter a respiração espontânea durante a experiência, através da inserção na traqueia de um tubo de polietileno (PE240, Intramedic<sup>®</sup>, Beckton and Dickinson) com cerca de 20 mm.

#### **3.3.2 O Circuito Arterio-Venoso**

O circuito arterio-venoso é um *shunt* vascular extra corporal, representado graficamente na figura 3.1, que permite a recolha de amostras de sangue arterial, facilita

a perfusão intravenosa de fármacos e possibilita a medição das pressões venosa e arterial em animais de pequeno porte.



**Figura 3.1:** O circuito arterio-venoso. Este circuito vascular extra-corporal liga a artéria carótida à veia jugular interna, permitindo a recolha rápida de amostras de sangue arterial bem como a administração intravenosa de fármacos, por punção da manga de silicone. A monitorização contínua da pressão do circuito permite identificar oclusões mecânicas ou oclusões devidas à formação de coágulos, tanto no lado arterial como no lado venoso. Figura adaptada de (Lautt et al., 1998a)

O circuito é constituído por uma manga de silicone de cerca de 10 cm de comprimento (MasterFlex Platinum®, Cole Parmer) conectada a dois segmentos de tubo de polietileno PE 50, de 12 cm cada (Intramedic®, Beckton and Dickinson), que funcionam como catéteres vasculares. A ligação dos cateteres com a manga de silicone

foi feita com um pequeno tubo de polietileno com cerca de 4 mm de comprimento (Tygon Micro-Bore® .04ID/07OD, Cole Parmer). Utilizou-se fita adesiva para ligar as extremidades da manga de silicone de forma a criar uma estrutura em forma de U. No meio da manga de silicone inseriu-se um conector em forma de "T". Na terceira extremidade do conector ligou-se um transdutor de pressões arteriais associado a um sistema de aquisição de dados Power Lab/8s ADInstruments, para monitorizar continuamente a pressão arterial média (PAM) do animal.

Uma vez que o uso de circuitos vasculares extra corporais aumenta a probabilidade de formação de coágulos, o circuito arterio-venoso foi previamente preenchido com heparina (200UI/ml).

Após montagem do circuito vascular, isolaram-se a artéria carótida e veia jugular externa sob um microscópio de dissecação (Nikon SMZ-2B) e um sistema de iluminação fria (KL750 SCHOTT). A artéria carótida e a veia jugular interna foram cateterizadas com os cateteres vasculares do circuito arterio-venoso. Depois da cateterização dos vasos, determinou-se a PAM do animal ocluindo-se o lado venoso da manga de silicone com um hemostato. A anestesia foi mantida durante a experiência através da perfusão contínua de pentobarbital sódico (2 mg/ml, administrado à velocidade de 0.5 ml/100 g peso corporal/h) no lado venoso do circuito, com a ajuda de uma bomba de perfusão (Perfusor® fm, B-Braun) e de acordo com as normas de bem estar animal (Diehl *et al.*, 2001; Van Zutphen, 2001). Depois de induzida, a anestesia foi testada periodicamente durante a experiência recorrendo ao estímulo doloroso da cauda e reflexo da pálpebra. A temperatura corporal foi monitorizada durante toda a experiência com o auxílio de uma sonda rectal ligada a uma unidade homeotérmica de aquecimento (Harvard Apparatus) e mantida a  $37.0 \pm 0.5$  °C.



### **3.3.3. Cateterização da veia porta**

Realizou-se uma laparotomia mediana, seguida do isolamento da veia porta e da punção da mesma com um catéter intravenoso (24 g Optiva IV, 19 mm Johnson & Johnson). Este catéter foi fixado com cola biológica (Histoacryl®, B-Braun) e posteriormente conectado com um tubo de polietileno (PE 90, Intramedic®, Beckton and Dickinson) para permitir a perfusão intraportal de fármacos.

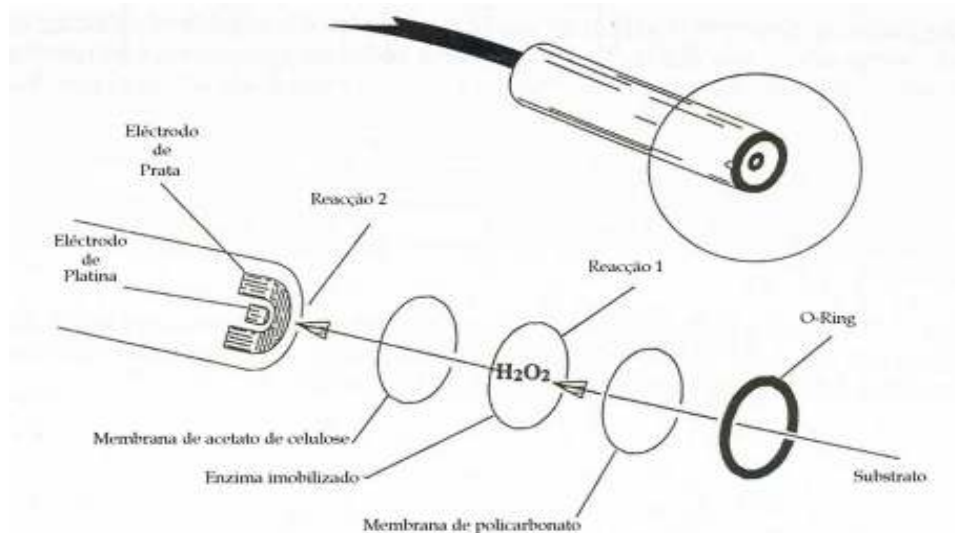
Após as cateterizações, foi assegurado um período mínimo de estabilização de 30 minutos antes de ser efectuado qualquer outro procedimento.

### **3.4. QUANTIFICAÇÃO DA GLICÉMIA**

Após o período de estabilização recolheram-se amostras de sangue arterial através de punção da manga de silicone, do lado arterial do circuito, com ajuda de uma microseringa de 25 µL (YSI Model 1501 Syringepet).

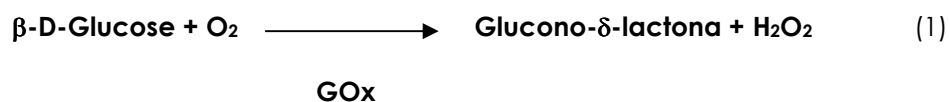
Foi determinada a glicémia arterial com um analisador de glucose (YSI 1500 Sidekick) até serem obtidos três valores estáveis. A média desses três pontos correspondeu ao nível de glicémia arterial basal.

O analisador de glucose YSI 1500 Sidekick é um equipamento desenvolvido para laboratórios de investigação biomédica que permite a quantificação rápida da glicémia pelo método enzimático do glucose oxidase (GOx). Este aparelho é constituído por uma sonda equipada com uma membrana de três camadas que contém o enzima GOx imobilizado na camada do meio, como ilustrado na figura 3.2.

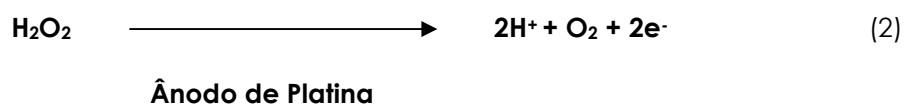


**Figura 3.2:** Esquemática da sonda do analisador de glicose. A sonda contém uma membrana de três camadas, em que a camada do meio contém o enzima glucose oxidase imobilizado. Figura adaptada de (YSI, 2001).

A extremidade da sonda, coberta pela membrana, está situada numa câmara reaccional. Quando a amostra é injectada na câmara, o substrato é rapidamente oxidado pelo enzima imobilizado, levando à síntese de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e de glucono- $\delta$ -lactona, de acordo com a reacção (1).



O  $H_2O_2$  é, por sua vez, oxidado no eléctrodo de platina produzindo electrões como descrito na reacção (2).



Quando as velocidades de formação e libertação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  se tornam constantes, atinge-se um equilíbrio dinâmico indicado por uma resposta de estado estacionário. Nesta altura o fluxo de electrões produzido é linearmente proporcional à concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e, portanto, proporcional à concentração de glucose.

O eléctrodo de platina é mantido a um potencial anódico sendo capaz de oxidar várias substâncias para além de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Para evitar que estes agentes redutores contribuam para a corrente gerada e detectada pelo sensor, a membrana contém uma camada interna que consiste numa película muito fina de acetato de celulose. Esta película permite a passagem de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mas exclui compostos químicos com massa molecular superior a 200 Da. A película de acetato de celulose também protege a superfície de platina de proteínas, detergentes e outras substâncias que a possam danificar.

### **3.5. O RIST (Teste Rápido de Sensibilidade à Insulina)**

A metodologia escolhida para avaliar a sensibilidade à insulina foi o teste rápido de sensibilidade à insulina ou RIST.

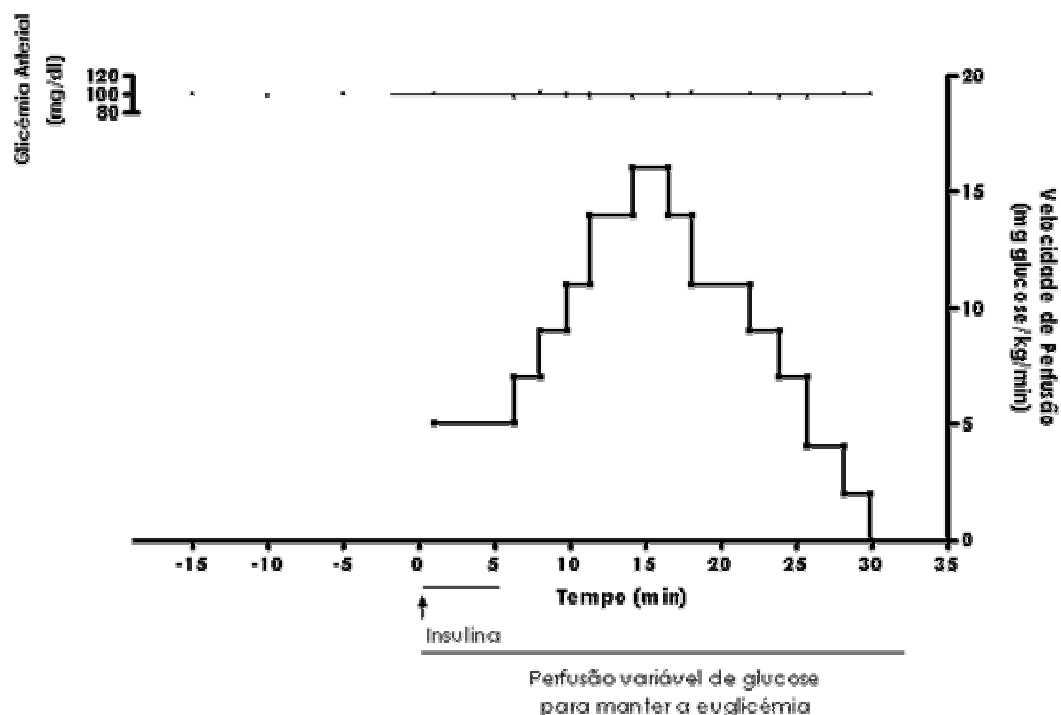
Este teste é um *clamp* euglicémico modificado que apresenta várias características vantajosas em termos de desenho experimental. Destaca-se o facto de o RIST ser um teste de curta duração (cerca de 35 min), podendo ser realizados até 4 testes no mesmo animal, com elevada reprodutibilidade (Lautt *et al.*, 1998a). O RIST permite assim avaliar a sensibilidade à insulina antes e após cada tratamento farmacológico, no mesmo animal, possibilitando um desenho experimental emparelhado. Para além disso, por ser um teste euglicémico não provoca alterações nos níveis de hormonas contra-reguladoras tais como glucagina, somatostatina e catecolaminas, permitindo uma avaliação exclusiva da acção da insulina (Xie *et al.*, 1995a). Uma outra vantagem, já referida anteriormente, diz respeito ao facto de o RIST poder ser realizado em animais anestesiados sendo os

resultados independentes da anestesia com pentobarbital sódico (Latour *et al.*, 2002). As vantagens do RIST comparativamente a outros métodos de avaliação da sensibilidade à insulina serão abordadas mais detalhadamente no capítulo 8 (Discussão Geral).

O RIST iniciou-se com a perfusão de um bólus de insulina 50 mU/kg/min durante 5 minutos (velocidade de perfusão de 6 ml/h, correspondendo a um volume de 0.5 ml perfundido durante 5 min) após a determinação do nível basal de glicémia. Ao primeiro minuto após o início da perfusão de insulina, efectuou-se a primeira colheita de sangue arterial para determinação da glicémia. Simultaneamente iniciou-se a perfusão da solução de glucose 100 mg/ml, a uma velocidade correspondente a 5 mg glucose/kg/min.

Com base nas concentrações de glucose arterial medidas em intervalos de 2 minutos, a velocidade de perfusão de glucose foi ajustada de forma a manter a euglicémia relativamente ao valor basal determinado antes do início do RIST. O RIST deu-se por concluído quando os níveis de glucose arterial retomaram o valor inicial, sem que fosse necessário continuar a perfundir glucose (Lautt *et al.*, 1998a).

A quantidade total de glucose perfundida (mg/kg) durante o período de duração do teste foi designada por **RIST Index** e corresponde à área sob a curva traçada pela perfusão variável de glucose (Lautt *et al.*, 1998a). O RIST Index foi o parâmetro utilizado para avaliar a sensibilidade à insulina e pode ser representado tanto como perfil dinâmico como sob a forma de gráfico de barras. Na figura 3.3 apresenta-se um perfil típico de um RIST.



**Figura 3.3:** Perfil típico de um RIST ao longo do tempo. Foi estabelecida a linha basal de euglicemia através de leitura de amostras de sangue arterial com intervalos de 5 min. De seguida foi perfundida insulina 50 mU/kg, durante 5 min, por via intravenosa. Ao minuto 1 iniciou-se a perfusão de glucose (5 mg/kg/min) e recolheu-se a primeira amostra de sangue arterial para determinação da glicémia. Com base nas concentrações arteriais de glucose medidas de 2 em 2 min ajustou-se a perfusão de glucose para manter a euglicémia. A quantidade total de glucose perfundida ao longo do teste (mg glucose/kg) corresponde à área sob a curva representada e foi designada por RIST Index. O RIST Index é o parâmetro utilizado para avaliar a sensibilidade à insulina. Figura adaptada de (Lautt *et al.*, 1998a).

Após a conclusão do teste foi administrado um suplemento de fluidos de 0,5 ml de soro fisiológico e heparina. Monitorizou-se a PAM e seguiu-se um período de reestabilização do animal, de cerca de 30 min.

### 3.6. ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

A administração de fármacos foi efectuada através de punção da manga de silicone do lado venoso do circuito vascular, no caso das administrações por via intravenosa (iv), e através do catéter inserido na veia porta, no caso das administrações intraportais (ipv). A utilização destes dois modos de administração teve em vista a identificação da contribuição do fígado para a resposta aos fármacos em estudo, comparativamente à administração no circuito vascular, considerada uma administração sistémica.

As velocidades de perfusão foram escolhidas com base em testes preliminares realizados com soro fisiológico. Observou-se que, para administrações intraportais, a perfusão de soro fisiológico a uma velocidade de 1 ml/h não induzia alterações metabólicas ou hemodinâmicas nos animais. Para administrações feitas através do circuito arterio-venoso, constatou-se que velocidades de perfusão até 6 ml/h não modificavam quer os valores de PAM, quer os valores de glicémia. Todas as perfusões de fármacos foram realizadas utilizando bombas de perfusão Perfusor fm<sup>®</sup> da B-Braun.

A partir do momento em que se iniciaram as perfusões intravenosas, as experiências tiveram a duração máxima de 3 h. A quantidade média de anestésico, glucose, insulina e fármacos perfundida nestes animais foi de cerca de 1ml/100g peso corporal/h, valor que está de acordo com o recomendado para compensar as perdas hídricas pela intervenção cirúrgica e pela recolha de amostras de sangue (entre 1 e 1,5 ml/100g peso corporal/h) (Akerstrom *et al.*, 1989; Diehl *et al.*, 2001; Van Zutphen, 2001).

Após as manipulações farmacológicas estabeleceu-se um novo nível de glucose arterial basal e foi realizado um novo RIST para avaliar o efeito do fármaco na sensibilidade à insulina.

### 3.7. QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONO HEPÁTICO

Sempre que o protocolo o requeria, o lóbulo médio do fígado foi dissecado e armazenado em azoto líquido (-180 °C) no final das experiências. O glutathione hepático foi quantificado usando o método do peroxidase-redutase descrito por Marinho *et al.*, no qual foram introduzidas algumas modificações (Marinho *et al.*, 1997).

Este método quantifica o glutathione hepático total. O princípio da técnica consiste em oxidar todo o glutathione presente no fígado, utilizando o enzima GSH peroxidase, sendo avaliada espectrofotometricamente a sua redução de volta a GSH, através do consumo de fosfato de dinucleótido de adenina e nicotinamida reduzido (NADPH), num passo catalisado pelo enzima GSSG redutase, de acordo com a reacção (3):



A amostra de fígado foi triturada num almofariz tendo o cuidado de adicionar constantemente azoto líquido, de modo a evitar o descongelamento. Uma vez pulverizada, a amostra foi pesada num gobelet previamente tarado contendo 1.5 ml de ácido meta-fosfórico (HPO<sub>3</sub>) 10 % (p/v). Em seguida homogeneizou-se a amostra com a ajuda de um homogeneizador Potter-Ehlvejem Pellet-Pestle da Sigma-Aldrich.

O homogenato foi centrifugado a 30000 g durante 20 minutos numa ultra-centrífuga L8-70 Beckman, com um rotor 70.1 Ti, a 4 °C. Recolheu-se o sobrenadante e neutralizou-se com hidróxido de potássio (KOH) 2 M. Adicionou-se glutathione peroxidase (15 U/g de fígado) e 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao sobrenadante neutralizado e a mistura foi incubada durante 30 minutos a 30 °C. Parou-se a reacção com 250 µl de HPO<sub>3</sub> 10 % (p/v) a 0 °C.

O doseamento espectrofotométrico do GSSG foi realizado através da monitorização do consumo de NADPH a 340 nm utilizando um espectrofotómetro Beckman DU 650. Para isto adicionou-se a uma cuvette 2 ml de tampão fosfatos de potássio 0.25 M (pH 7.4), 200 µl de sobrenadante e 10 µl de NADPH 7.5 mM. Determinou-se a absorvância basal da solução a este comprimento de onda. Posteriormente adicionou-se 20 µl de GSSG redutase (47 U/g de fígado) e quantificou-se o decréscimo de absorvância devido à oxidação do NADPH pelo GSSG redutase. Foi realizado um ensaio em branco para avaliar a oxidação espontânea do NADPH.

### **3.8. MÉTODOS ESTATÍSTICOS**

Os valores apresentados ao longo deste trabalho correspondem a médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM).

A significância da diferença entre os valores médios foi calculada através de testes não paramétricos de Wilcoxon ou Mann-Whitney consoante o desenho experimental fosse emparelhado ou não emparelhado, respectivamente, ou através de testes de Kruskal- Wallis ou testes de Friedman, seguido de teste de Dunns, quando aplicáveis.

Para valores de  $p < 0.05$  considerou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas. Utilizou-se o programa *GraphPad Prism* versão 4.0 para a elaboração dos gráficos e tratamento estatístico dos dados. Os gráficos dos perfis dinâmicos dos RISTs foram realizados no programa *Excel*.

### **3.9. REAGENTES E SOLUÇÕES**

A D-glucose, sulfato de atropina, nitroprussiato de sódio (SNP), N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), 3-hidrocloreto de morfolinosidnonimina (SIN-1), cloreto de acetilcolina, azul de metileno (AM), 1H- [1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), L-butionina



sulfoximina (BSO), GSH peroxidase, GSSG redutase, NADPH,  $\text{HPO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , S-nitrosoglutationo (GSNO) e S-nitrosoacetilpenicilamina (SNAP) foram adquiridos à SIGMA-Aldrich Chemical Co., Portugal.

A solução de pentobarbital sódico-Eutasil<sup>®</sup> foi adquirida à Sanofi Veterinária, Portugal. A heparina, NaCl 0.9 %, e a cola biológica (Histoacryl<sup>®</sup>) foram adquiridos à B-Braun, Portugal. A insulina - Humulin<sup>®</sup> da Lilly, Portugal. O éster monoetilo de glutatióno (GSH-E) foi adquirido à Bachem, Suíça. Todos os reagentes eram do maior grau de pureza existente no mercado.

Todas as soluções foram preparadas em solução de NaCl 0.9 % com excepção das soluções de ODQ e SNAP que foram preparadas em etanol 1 % (v/v).

## **4. A INTERRUPÇÃO DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL ACh/NO/GMP<sub>c</sub> NO FÍGADO INDUZ RESISTÊNCIA À INSULINA**

### **4.1. INTRODUÇÃO**

Embora esteja já demonstrado o papel crucial dos nervos parassimpáticos hepáticos (Xie *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1995a) e do NOS hepático (Sadri *et al.*, 1998; Sadri *et al.*, 1999) na modulação da sensibilidade à insulina, continua por esclarecer qual a sequência de eventos moleculares que conduzem à libertação da HISS. A questão torna-se especialmente pertinente uma vez que, apesar de extensamente descrito na literatura que a ligação de ACh a receptores muscarínicos conduz à síntese de NO, existem sistemas fisiológicos - nomeadamente o sistema nervoso central (Leonard *et al.*, 1997) e o sistema nervoso entérico (Smith *et al.*, 1998)- em que os papéis se invertem, passando o NO sintetizado pelo NOS a modular a libertação de ACh pelos terminais colinérgicos. Com o intuito de esclarecer a via de sinalização que conduz à síntese da HISS, avaliou-se se a activação do NOS hepático é uma consequência da activação dos nervos parassimpáticos hepáticos ou se, pelo contrário, constitui um passo a montante na via de sinalização, sendo o NO o sinal para a libertação de ACh no fígado.

Um outro ponto ainda por esclarecer, na via de síntese da HISS, diz respeito a potenciais receptores para o NO produzido pelo fígado. Ignarro *et al.* demonstraram que um dos alvos-chave deste radical é o grupo heme do enzima guanilato ciclase que se encontra envolvido em vários processos mediados pelo NO, tais como os que ocorrem no relaxamento do músculo liso (Palmer *et al.*, 1988), na inibição da agregação plaquetária (Radomski *et al.*, 1991) e na sinalização neuronal (Ignarro *et al.*, 1990). O GC é assim um candidato natural a receptor do NO na via de sinalização da HISS.

Neste capítulo testou-se a hipótese de que o NO hepático envolvido na libertação da HISS é sintetizado em resposta à ligação de ACh a receptores muscarínicos no fígado.

Comparou-se assim o efeito de diferentes dadores de NO e de um agonista colinérgico na reversão da resistência à insulina induzida, quer por bloqueio dos receptores muscarínicos, como por inibição do NOS. Avaliou-se ainda o papel do GC na libertação da HISS recorrendo a inibidores deste enzima.

## **4.2. PROTOCOLOS**

Os animais foram sujeitos a um jejum de 24 h, seguido de um período de 1 hora de livre acesso à comida, de forma a maximizar a acção da HISS. Desta forma, todos os protocolos foram realizados em animais no estado pós-prandial.

Foi realizado o procedimento cirúrgico tal como descrito no capítulo 3.3. Nos protocolos que envolveram a infusão intraportal de fármacos foi necessário cateterizar a veia porta. A sensibilidade à insulina foi avaliada utilizando o RIST, descrito previamente no capítulo 3.5. A temperatura corporal dos animais e os valores de PAM foram registados periodicamente durante as experiências.

## **4.3. RESULTADOS**

### **4.3.1. Efeito do inibidor do NOS hepático, L-NAME, na resistência à insulina ao longo do tempo**

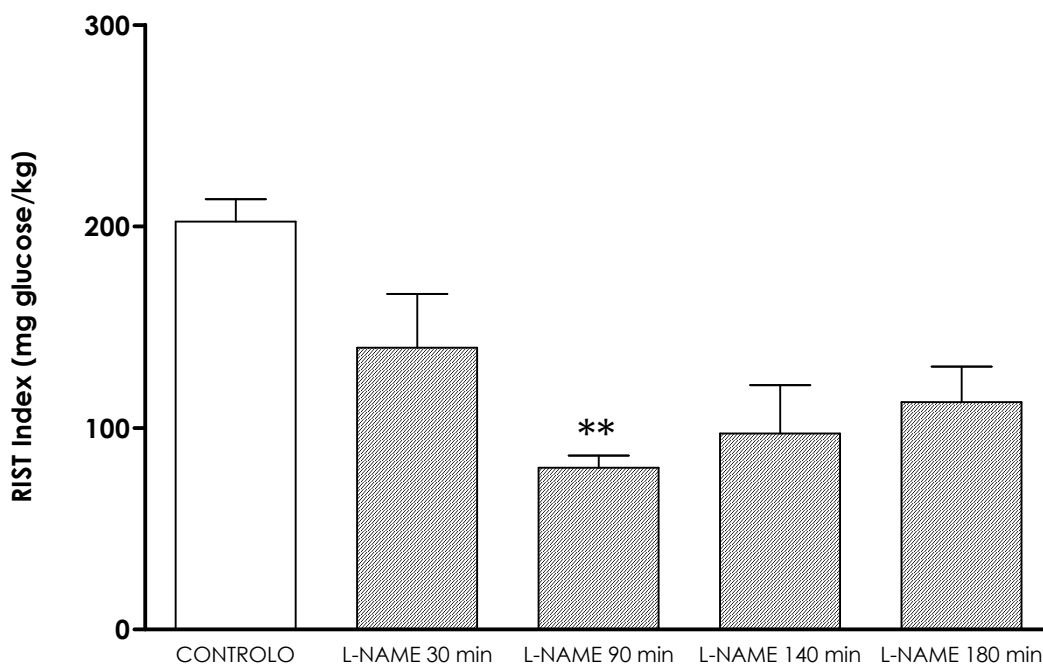
Foram realizadas experiências preliminares para determinar qual a duração da resistência à insulina induzida pelo antagonista do NOS, L-NAME, administrado numa dose de 1 mg/kg por via intraportal.

Realizou-se um RIST controlo, e em seguida administrou-se um bólus de 0.4 ml de L-NAME 1 mg/kg na veia porta. Determinou-se o nível de glucose arterial basal e realizou-se um RIST após L-NAME. Depois de um período de estabilização de cerca de 30 min

realizaram-se RISTs consecutivos com o intuito de medir a duração da acção desta dose de L-NAME na sensibilidade à insulina.

Observou-se um aumento na PAM após a administração de L-NAME de  $119.3 \pm 4.0$  mmHg para  $141.4 \pm 3.2$  mmHg ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ). Os valores de glicémia basal variaram entre  $109.6 \pm 3.6$  mg/ml e  $104.5 \pm 3.9$  mg/ml.

Os resultados relativos aos valores de RIST Index obtidos encontram-se representados graficamente na figura 4.1.



**Figura 4.1:** Efeito da administração intraportal de L-NAME 1 mg/kg no RIST Index ao longo do tempo. O L-NAME diminuiu o RIST Index, tendo sido observado um efeito máximo aos 90 min, com uma redução de  $59.5 \pm 4.3$  % da sensibilidade à insulina. A partir dos 90 min o valor do RIST Index mostrou uma tendência para aumentar. Teste de Friedman,  $n=5$ ,  $p < 0.01$  seguido de teste de Dunns \*\*=  $p < 0.01$  em relação ao controlo.

O RIST Index controlo foi de  $202.4 \pm 11.1$  mg glucose/kg. Cerca de 30 min após a administração de L-NAME o valor do RIST Index foi de  $139.8 \pm 26.7$  mg glucose/kg, o que representou um decréscimo da sensibilidade à insulina de  $28.9 \pm 14.9$  %. Após 90 min o RIST foi de  $80.2 \pm 6.1$  mg glucose/kg com uma inibição de  $59.5 \pm 4.3$  % da sensibilidade à insulina ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ). Ao fim de 140 min o valor do RIST Index foi de  $97.3 \pm 24.0$  mg glucose/kg, o que correspondeu a uma inibição de  $50.7 \pm 12.9$  %. Finalmente, ao fim de 180 min, o RIST Index atingiu valores de  $112.8 \pm 17.7$  mg glucose/kg, sendo a inibição de  $43.4 \pm 9.8$  %.

Com base nos resultados destas experiências, foi escolhido um intervalo de tempo após administração de L-NAME que permitisse a realização de dois RISTs durante o tempo de inibição máxima da sensibilidade à insulina dependente da HISS. Determinou-se que o tempo adequado para o início do primeiro RIST após L-NAME era de 60 min.

#### **4.3.2. Efeito de dadores de NO na resistência à insulina que se observa após a inibição do NOS hepático**

Esta série de experiências pretendeu determinar qual o dador de NO mais eficaz na reversão da resistência à insulina dependente da HISS induzida pelo antagonismo do NOS hepático. Para isso utilizaram-se dois dadores de NO, quimicamente distintos.

Os dadores de NO escolhidos foram o 3-hidrocloreto de morfolinosidnonimina (SIN-1), que liberta simultaneamente NO e  $O_2^{\bullet}$  (Schrammel *et al.*, 1998), e o nitroprussiato de sódio (SNP) que liberta exclusivamente NO de forma espontânea na corrente sanguínea (Feelisch *et al.*, 1987).

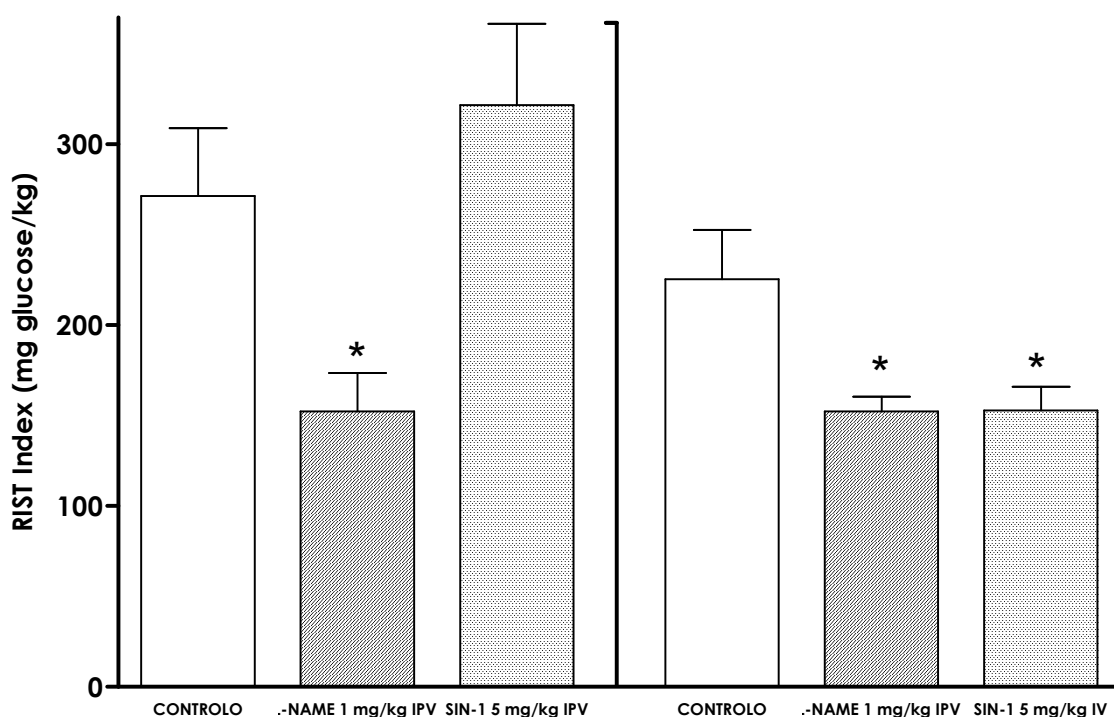
Para determinar se o fígado seria o órgão alvo na modulação da sensibilidade à insulina pelo NO, foram comparados os efeitos observados após perfusão de SIN-1 e de SNP por via intraportal e por via intravenosa.

#### **4.3.2.1. SIN-1 (3-hidrocloro de morfolinosidnonimina)**

Efectuou-se um RIST controlo, seguido de um RIST realizado 60 min após administração de L-NAME (1 mg/kg) em bólus de 0.4 ml, por via intraportal. Após o segundo RIST, administrou-se um bólus de 0.4 ml de SIN-1 (5 mg/kg), por via intraportal ou por via intravenosa, e estabeleceu-se um segundo nível de glucose arterial basal. A dose de SIN-1 foi escolhida com base em experiências previamente realizadas (Sadri *et al.*, 1999). Realizou-se um terceiro RIST após administração de SIN-1.

O SIN-1, administrado por via intraportal, reduziu significativamente os valores da PAM de  $116.0 \pm 4.9$  mmHg para  $70.0 \pm 3.2$  mmHg ( $p < 0.001$ ,  $n=5$ ) e provocou um aumento na glicémia basal de  $110.5 \pm 6.0$  mg/ml para  $137.2 \pm 10.1$  mg/ml ( $p < 0.05$ ,  $n=5$ ). O efeito da administração intravenosa do fármaco foi muito semelhante, quer no valor de PAM (de  $120.8 \pm 5.4$  mmHg para  $80.8 \pm 6.5$  mmHg,  $p < 0.001$ ,  $n=4$ ), quer no valor da glicémia (de  $121 \pm 3.4$  mg/ml para  $139.2 \pm 9.7$  mg/ml,  $p < 0.05$ ,  $n=4$ ). Tanto a PAM como a glicémia mantiveram-se estáveis ao longo do RIST.

Os valores de RIST Index obtidos nesta série de experiências estão representados graficamente na figura 4.2.



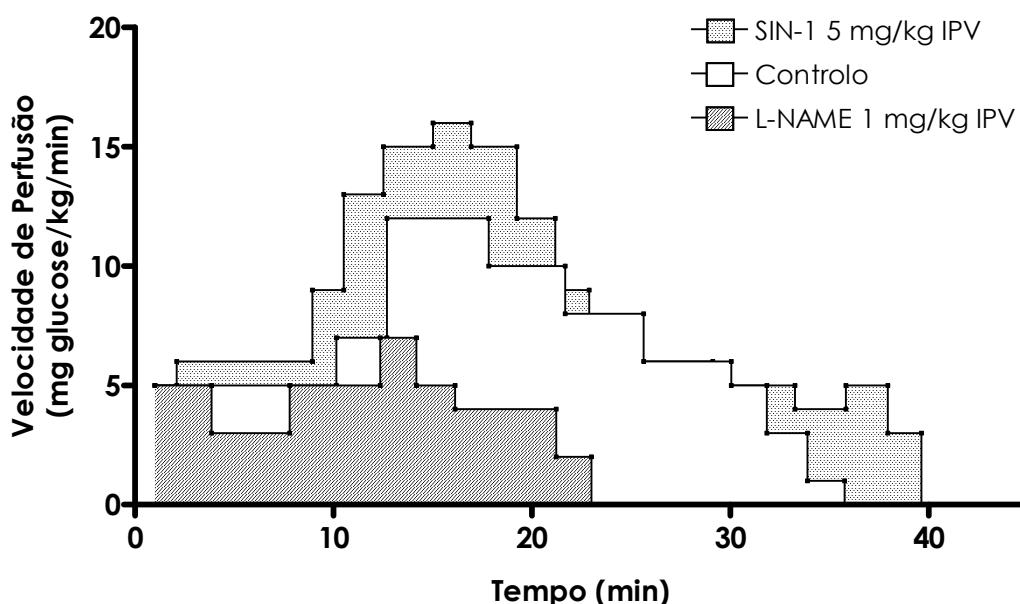
**Figura 4.2:** A administração intraportal (ipv) de L-NAME 1 mg/kg reduziu significativamente o RIST Index nos dois grupos de animais estudados. A administração ipv de SIN-1 5 mg/kg reverteu o valor do RIST para valores idênticos aos do RIST controle (Teste de Friedman,  $n=5$ ,  $p < 0.001$ ). A administração intravenosa (iv) do fármaco não reverteu a resistência à insulina induzida pelo L-NAME (Teste de Friedman,  $n=4$ ,  $p < 0.05$ ). Teste de Dunns  $*=p < 0.05$  em relação ao controle.

No primeiro grupo de animais o valor do RIST Index foi de  $271.3 \pm 37.6$  mg glucose/kg. Após administração de L-NAME o valor do RIST Index decresceu para  $152.2 \pm 21.30$  mg glucose/kg ( $p < 0.05$ ,  $n=5$ ), diminuindo a sensibilidade à insulina em  $43.4 \pm 2.1$  %. O SIN-1 (5 mg/kg), administrado por via intraportal, aumentou o RIST Index para  $321.7 \pm 44.7$  mg glucose/kg.

No segundo grupo de animais o valor do RIST Index controle foi de  $225.3 \pm 27.3$  mg glucose/kg, tendo decrescido para  $152.3 \pm 7.1$  mg glucose/kg ( $p < 0.05$ ,  $n=4$ ) após administração de L-NAME com uma inibição da sensibilidade à insulina de  $37.0 \pm 7.7$  %. Não se observaram alterações no valor do RIST Index após administração de

SIN-1 5 mg/kg por via intravenosa ( $152.8 \pm 13.1$  mg glucose /kg,  $p < 0.05$ ,  $n=4$ , em relação ao controlo).

Na figura 4.3 estão representados os perfis dinâmicos dos RISTs obtidos na situação controlo, após a administração intraportal de L-NAME 1 mg/kg e após a administração intraportal de SIN-1 5 mg/kg, numa experiência padrão. Observou-se que a administração intraportal de L-NAME reduziu significativamente o RIST Index. A administração ipv de SIN-1 reverteu o valor do RIST para valores superiores ao do RIST controlo, com uma duração média superior e um pico de acção com maior magnitude.



**Figura 4.3:** Perfis dinâmicos dos RISTs controlo, após L-NAME e após SIN-1 intraportal (ipv) numa experiência realizada num animal deste grupo. Observou-se que a administração de SIN-1 reverteu a inibição da sensibilidade à insulina induzida pelo inibidor do NOS, L-NAME, dando origem a um RIST com uma duração média superior e um pico de acção com maior magnitude em relação ao do RIST controlo.



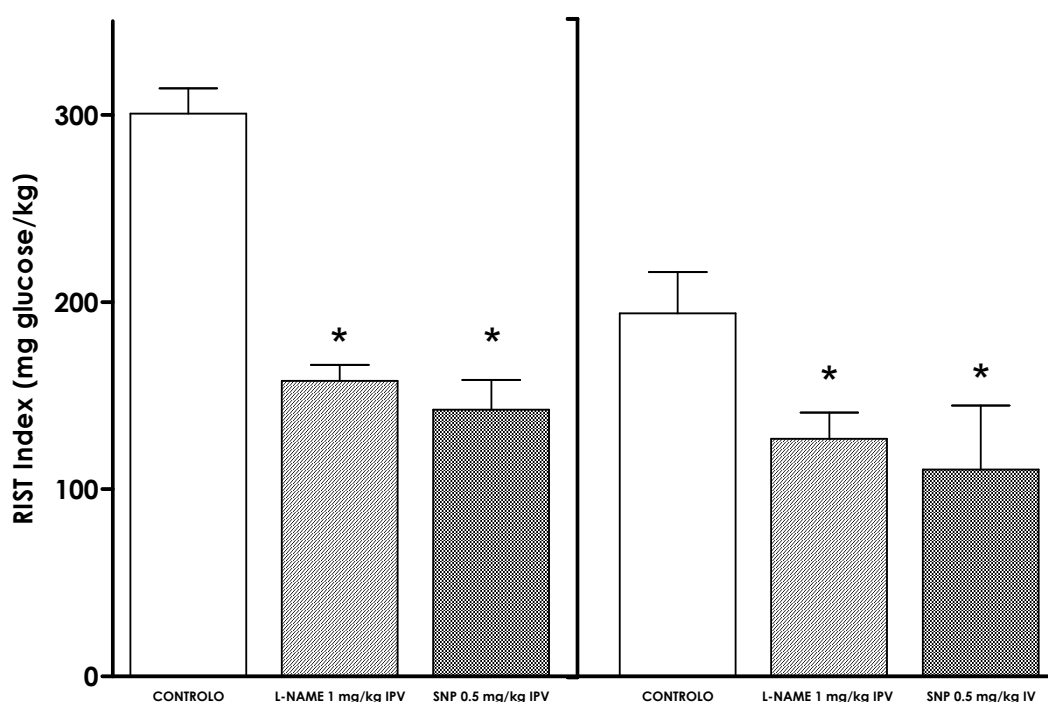
#### **4.3.2.2. SNP (nitroprussiato de sódio)**

Realizou-se um RIST controlo, seguido de um segundo RIST realizado 60 min após administração de L-NAME 1 mg/kg em bólus de 0.4 ml, por via intraportal. Depois do período de estabilização, administrou-se SNP 0.5 mg/kg por via intraportal ou por via intravenosa (perfusão contínua durante todo o RIST a 1 ml/h), até se obter um novo nível de glicémia basal para se realizar um terceiro RIST.

A dose de SNP 0.5 mg/kg foi escolhida com base em ensaios de dose – resposta, medida em termos de decréscimo na PAM, realizados preliminarmente no laboratório. Com a dose de 0.5 mg/kg de SNP obteve-se um decréscimo na PAM de magnitude semelhante ao observado após administração de SIN-1 5 mg/kg. A administração foi feita em perfusão contínua uma vez que o tempo de semi-vida do SNP é muito curto (Schulz, 1984).

A acção hemodinâmica do SNP, administrado por via intraportal, foi semelhante à observada anteriormente com o dador de NO, SIN-1, sendo que a PAM diminuiu de  $122.5 \pm 2.5$  mmHg para  $85.0 \pm 5.6$  mmHg ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ ). A glicémia basal aumentou de  $108.5 \pm 5.2$  mg/ml para  $129.3 \pm 3.8$  mg/ml ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) após administração do fármaco. A PAM regressou aos valores basais no final da experiência, após paragem da perfusão de SNP.

Na figura 4.4 estão representados graficamente os valores de RIST Index obtidos nesta série de experiências.



**Figura 4.4:** A administração intraportal (ipv) de L-NAME 1 mg/kg reduziu significativamente o RIST Index. A administração de SNP 0.5 mg/kg não reverteu o valor do RIST, quer quando administrado ipv (Teste de Friedman,  $n=6$ ,  $p < 0.01$ ), quer iv (Teste de Friedman,  $n=5$ ,  $p < 0.05$ ). Teste de Dunns \*=  $p < 0.05$  em relação ao controlo.

Na série de experiências em que se administrou SNP 0.5 mg/kg por via intraportal, o valor do RIST Index controlo foi de  $300.7 \pm 13.5$  mg glucose/kg. A administração de L-NAME reduziu significativamente o valor para  $157.9 \pm 8.4$  mg glucose/kg para ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ). A inibição foi de  $47.0 \pm 3.4$  %. A administração intraportal de SNP conduziu a um RIST Index de  $142.5 \pm 15.8$  mg glucose/kg, valor que não tem diferença estatisticamente significativa do RIST Index após administração de L-NAME.

Na segunda série de experiências, o RIST Index controlo foi de  $212.8 \pm 15.1$  mg glucose/kg, tendo diminuído para  $135.0 \pm 14.7$  mg glucose/kg ( $p < 0.05$ ,  $n=5$ ) após administração intraportal de L-NAME, o que corresponde a uma inibição de  $32.8 \pm 5.9$  % da acção da insulina. O RIST Index após perfusão de SNP 0.5 mg/kg por via intravenosa foi de

125.2±34.1 mg glucose/kg, valor que não é significativamente diferente do valor do RIST após L-NAME.

#### **4.3.3. Efeito do dador de NO, SIN-1 na resistência à insulina que se observa após inibição dos receptores muscarínicos**

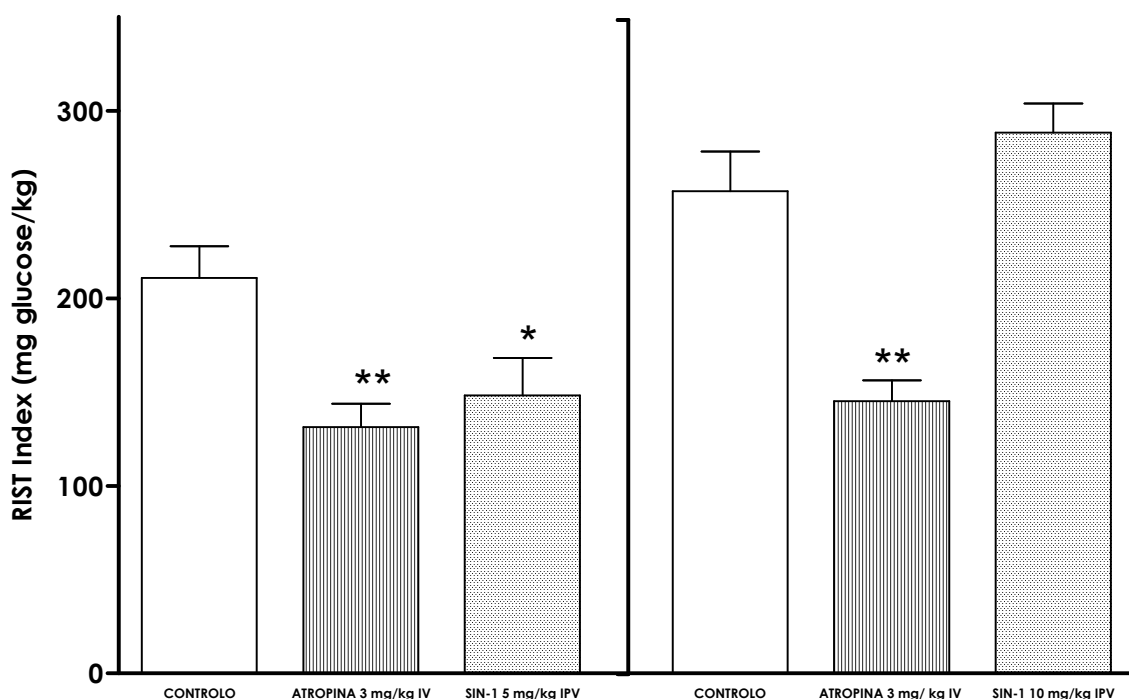
Sendo o SIN-1 o dador de NO que mostrou ter maior eficácia na reversão da inibição da HISS induzida pelo L-NAME, testou-se a sua capacidade de reversão da resistência à insulina induzida por inibição dos receptores muscarínicos com atropina, numa dose de 3mg/kg.

Realizou-se um RIST controlo, seguido de um RIST após administração de atropina 3 mg/kg, durante 5 min, por via intravenosa. Está descrito que esta dose de atropina bloqueia totalmente a acção da HISS, uma vez que mimetiza a resistência à insulina observada após desnervação cirúrgica do plexo hepático anterior (Xie *et al.*, 1994).

Em seguida, administrou-se um bólus de 0.4 ml do dador de NO, SIN-1, por via intraportal, numa dose de 5 mg/kg ou numa dose de 10 mg/kg. Após estabelecer novo nível basal de glicémia arterial, realizou-se um terceiro RIST para avaliar o efeito do SIN-1 na resistência à insulina induzida pela atropina.

Observou-se que a administração de 5 mg/kg de SIN-1 por via intraportal reduziu significativamente os valores da PAM de 135.0±15.0 mmHg para 65.0±9.2 mmHg ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ ) e provocou um aumento na glicémia basal de 117.3±3.3 mg/ml para 127.7±10.4 mg/ml ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ). Os efeitos da administração do SIN-1 na PAM (de 130.0±5.3 mmHg para 69.2±1.5 mmHg ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ ) e na glicémia (de 127.3±7.8 mg/ml para 140.7±9.5 mg/ml,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) foram semelhantes para a dose de 10 mg/kg.

Os resultados representados graficamente na figura 4.5 representam os valores de RIST Index obtidos.



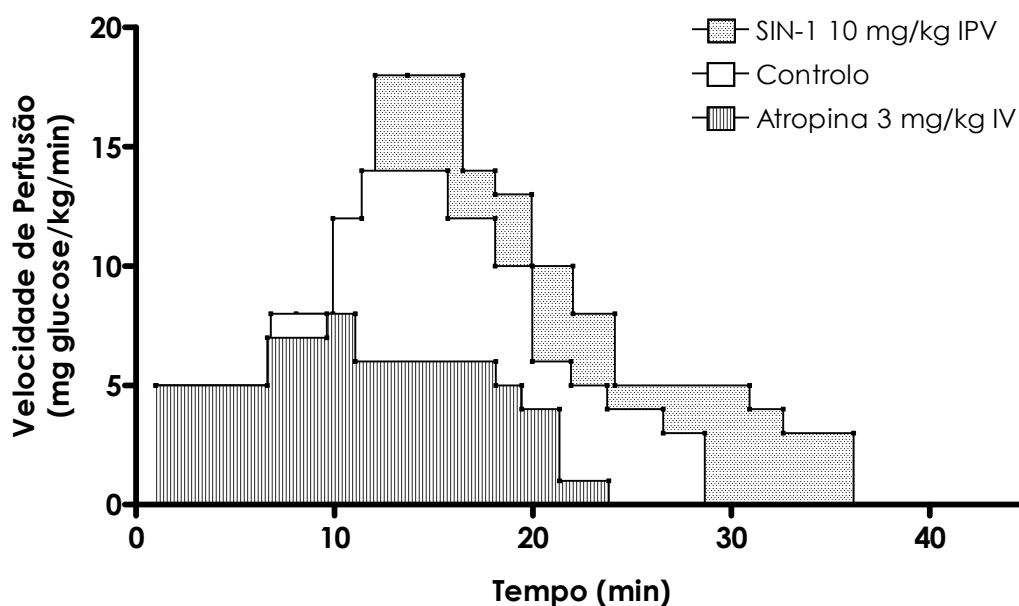
**Figura 4.5:** A administração intravenosa (iv) de atropina 3 mg/kg reduziu significativamente o RIST Index em ambos os grupos. A administração intraportal (ipv) de SIN-1 numa dose de 5 mg/kg não reverteu valor do RIST Index para valores controlo (Teste de Friedman,  $n=6$ ,  $p < 0.01$ ), enquanto que a dose de 10 mg/kg reverteu totalmente a inibição da sensibilidade à insulina induzida pela atropina, (Teste de Friedman,  $n=6$ ,  $p < 0.05$ ). \*\*= $p < 0.001$ ; \*= $p < 0.05$  em relação ao controlo (Teste de Dunns).

O RIST controlo para esta série de experiências foi de  $212.1 \pm 19.8$  mg glucose/kg. Após administração intravenosa de atropina o valor do RIST decresceu para  $131.3 \pm 14.7$  mg glucose/kg ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ), o que correspondeu a uma inibição de  $37.5 \pm 4.0$  % do RIST Index. Após administração intraportal de SIN-1 5 mg/kg constatou-se que o RIST Index passou a ser  $147.1 \pm 23.6$  mg glucose/kg ( $p < 0.05$  vs RIST controlo,  $n=6$ ).

Num segundo grupo de animais, a administração de atropina reduziu o RIST Index de  $257.1 \pm 21.1$  mg glucose/kg para  $145.2 \pm 11.0$  mg glucose/kg ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ), correspondendo a uma inibição de  $43.3 \pm 1.8$  %. A administração intraportal de SIN-1 numa dose mais

elevada (10 mg/kg) reverteu o RIST Index para valores controle (288.3±15.5 mg glucose/kg).

Na figura 4.6 estão representados os perfis dinâmicos dos RISTs obtidos na situação controle, após a administração de atropina 3 mg/kg e após administração intraportal de SIN-1 na dose de 10 mg/kg para uma experiência padrão. Observou-se que a atropina reduziu a magnitude do pico de acção hipoglicemiante, reduzindo também a duração do RIST. A administração de SIN-1 originou um perfil dinâmico mais aproximado ao do RIST controle, mas com maior magnitude e duração de acção.



**Figura 4.6:** Perfis dinâmicos dos RISTs controle, após atropina iv e após SIN-1 intraportal numa experiência realizada num animal representativo deste grupo. Observou-se que a administração de SIN-1 reverteu a inibição da sensibilidade à insulina induzida pela atropina dando origem a um RIST com perfil mais aproximado ao do RIST controle.

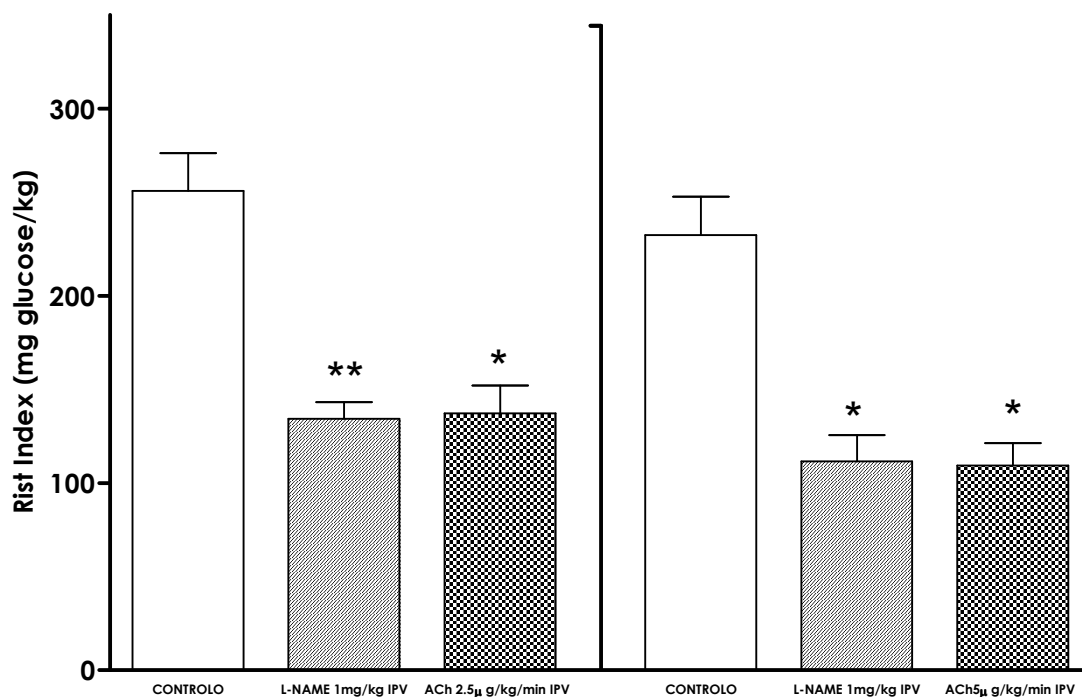
#### **4.3.4. Efeito da ACh na resistência à insulina que se observa após inibição do NOS hepático**

Foi realizado um RIST controle, seguido de um segundo RIST 60 min após administração de L-NAME (1 mg/kg por via intraportal), de forma a inibir a componente da acção da insulina dependente da HISS.

Posteriormente administrou-se uma solução de cloreto de ACh por via intraportal, sendo a taxa de administração do fármaco de 2.5 µg/kg/min ou de 5 µg/kg/min. Este fármaco foi administrado continuamente durante o RIST, a uma velocidade de perfusão de 1 ml/h uma vez que o cloreto de ACh é rapidamente inactivado no organismo (Osswald, 2000).

A administração intraportal de ACh, na dose mais elevada (taxa da administração de 5 µg/kg/min), não alterou significativamente nem a PAM (111.3±8.5 mmHg para 105.0±10.21 mmHg), nem a glicémia basal (121.2±6.72 mg/ml antes da perfusão de ACh 5 µg/kg/min e 125.2±3.7 mg/ml após a perfusão do fármaco).

A representação gráfica dos valores de RIST Index obtidos nesta série de experiências encontra-se na figura 4.7.



**Figura 4.7:** A administração intraportal de L-NAME 1 mg/kg reduziu significativamente o RIST Index em ambos os grupos de animais testados. A administração intraportal de ACh não reverteu a inibição da sensibilidade à insulina induzida pelo L-NAME, tanto na dose 2.5 μg/kg/min (Teste de Friedman, n=7, p <0.01) como na dose de 5 μg/kg/min (Teste de Friedman, n=6, p <0.01). Teste de Dunns \*\*= p<0.01; \*= p<0.05 em relação ao controlo.

No primeiro grupo de animais, a administração intraportal de L-NAME reduziu o RIST Index de 256.0±20.3 mg glucose/kg para 134.4 ± 8.9 mg glucose/kg (p <0.01, n=7). Este decréscimo implicou uma inibição de 49.0±3.6 % no índice de sensibilidade à insulina. A administração intraportal de ACh a 2.5 μg/kg/min não reverteu o RIST Index para valores controlo (137.2±14.8 mg glucose/kg, p <0.05 vs controlo, n=7).

No segundo grupo de animais o RIST Index controlo foi de 232.4 ± 20.4 mg glucose/kg. A administração intraportal de L-NAME inibiu o RIST Index em 49.4±7.9 % (RIST Index após L-NAME: 111.6 ± 13.9 mg glucose/kg, p <0.05, n=6). A administração intraportal de ACh numa taxa duas vezes superior à testada anteriormente (5 μg/kg/min) também não

reverteu a resistência à insulina induzida pelo L-NAME, uma vez que o RIST Index foi de  $109.4 \pm 11.9$  mg glucose/kg ( $p < 0.05$  vs controlo,  $n=6$ ).

#### **4.3.5. Envolvimento do guanilato ciclase na libertação da HISS**

A fim de avaliar o envolvimento do GC na via de sinalização da HISS foi realizado um RIST controlo seguido de um RIST na presença de azul-de-metileno (AM), um inibidor do GC, numa dose de  $300 \mu\text{g/kg}$  (Ming *et al.*, 2000). Para determinar se o fígado seria o órgão alvo para este fármaco, foi feita uma comparação entre o efeito observado após perfusão de AM por via intraportal e por via intravenosa a uma velocidade de perfusão de  $1 \text{ ml/h}$  durante  $10 \text{ min}$  (Ming *et al.*, 2000).

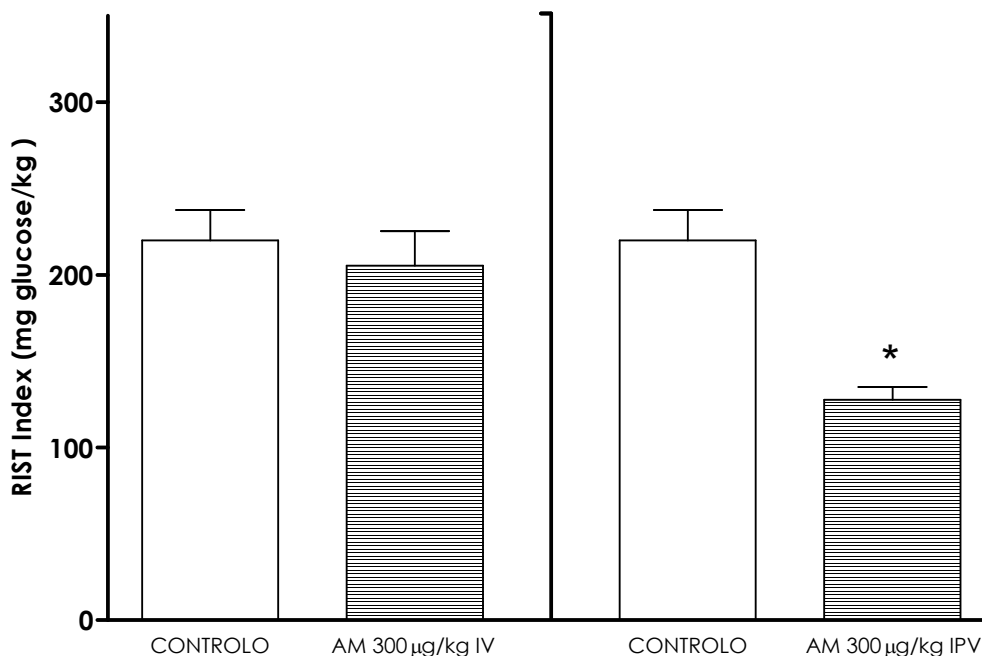
Testou-se ainda o efeito de um inibidor com elevada especificidade para o GC, o 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), na sensibilidade à insulina uma vez que o AM é um fármaco pouco selectivo para o GC, podendo também inibir o NOS (Hwang *et al.*, 1998). A dose de ODQ foi escolhida com base na literatura (Hwang *et al.*, 1998). Testou-se o efeito do ODQ  $1 \mu\text{g/kg}$  na sensibilidade à insulina, tendo o fármaco sido administrado sob a forma de um bólus de  $0.4 \text{ ml}$ . Foi realizado um RIST controlo seguido de um RIST após a perfusão de ODQ por via intraportal ou por via intravenosa.

##### **4.3.5.1. Azul de metileno**

Não se observaram quaisquer efeitos do AM, quer a nível dos valores de PAM, quer a nível dos valores de glicémia basal que se mantiveram após a perfusão do fármaco (numa situação controlo a PAM e glicémia basal registadas foram respectivamente  $104.7 \pm 3.1 \text{ mmHg}$  e  $147.7 \pm 12.6 \text{ mg/ml}$  glucose contra  $104.3 \pm 2.9 \text{ mmHg}$  e  $141.3 \pm 11.1 \text{ mg/ml}$  glucose após a perfusão de AM).



Na figura 4.8 encontra-se a representação gráfica dos resultados obtidos, em termos de RIST Index, nesta série de experiências.



**Figura 4.8:** A administração intravenosa (iv) de azul de metileno 300 µg/kg não alterou o RIST Index (n=5), enquanto que a administração intraportal (ipv) do fármaco reduziu o RIST Index em 45.0±5.2 %. Teste de Wilcoxon, n=7; \* = p <0.05.

O RIST Index controlo na primeira série de experiências foi de 220.6±17.3 mg glucose/kg. O AM administrado por via intravenosa não alterou RIST Index que foi 202.7±22.1 mg glucose/kg (n=5).

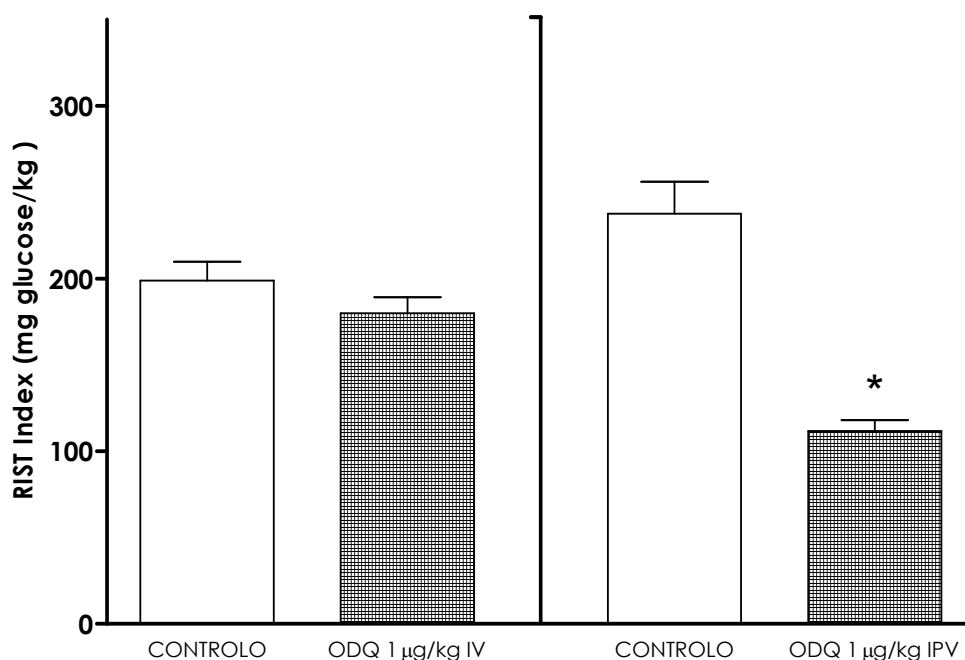
Por sua vez, a administração intraportal de AM reduziu o RIST Index de 220.1±17.6 mg glucose/kg para 127.5±7.4 mg glucose/kg (p <0.05, n=7). A inibição no valor do RIST foi de 45.0±5.2 %.

#### **4.3.5.2. ODQ (1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona)**

Para testar os efeitos do inibidor específico do guanilato ciclase, ODQ, foi necessário avaliar o efeito da perfusão de uma solução de etanol 1 % na sensibilidade à insulina, uma vez que o ODQ foi solubilizado numa solução de 1 % etanol em soro fisiológico. Para isto, realizou-se um RIST controlo seguido de um novo RIST após perfusão de um bólus de etanol 1 % (0.4 ml) por via intraportal (n=5) ou por via intravenosa. O RIST Index não sofreu alterações significativas após a administração de 0.3 ml/kg de etanol 1 %, quer quando a administração foi realizada por via intraportal (de  $209.7 \pm 15.5$  mg glucose/kg para  $182.4 \pm 15.0$  mg glucose/kg, n=5), quer por via intravenosa (de  $253.3 \pm 25.5$  mg glucose/kg para  $224.3 \pm 15.5$  mg glucose/kg, n=3).

Não se observaram quaisquer efeitos do ODQ, quer a nível dos valores de PAM, quer a nível dos valores de glicémia basal.

Na figura 4.9 encontram-se representados os RIST Index obtidos nesta série de experiências.



**Figura 4.9:** A administração intravenosa (iv) de ODQ 1µg/kg não alterou o RIST Index (n=7), enquanto que a administração intraportal (ipv) do fármaco reduziu significativamente o RIST Index. Teste de Wilcoxon, n=5, \*= p<0.05.

A administração intravenosa do ODQ alterou o RIST Index de  $198.9 \pm 10.9$  mg glucose/kg para  $180.1 \pm 9.2$  mg glucose/kg, o que não foi estatisticamente significativo (n=7). Por outro lado, a administração intraportal de ODQ 1 µg/kg reduziu a sensibilidade à insulina de  $237.6 \pm 18.6$  mg glucose/kg para  $111.7 \pm 6.2$  mg glucose/kg (p <0.05, n=5), conduzindo a uma inibição de  $51.0 \pm 6.8$  % da sensibilidade à insulina.

#### 4.4. DISCUSSÃO

O objectivo deste estudo foi clarificar o papel da ACh, do NO e do clássico efector do NO, o enzima guanilato ciclase, na via de sinalização que conduz à libertação da HISS.

Observou-se que a administração intraportal de ACh não reverteu a resistência à insulina dependente da HISS induzida por bloqueio da síntese de NO no fígado. Por outro lado, a administração intraportal de SIN-1, ao contrário do SNP, restaurou a acção da HISS tanto após antagonismo dos receptores muscarínicos hepáticos, como após inibição do NOS hepático. Os resultados sugerem que a síntese hepática de NO é um passo a jusante da activação de receptores muscarínicos pela ACh na via de sinalização da HISS e que o dador de NO, SIN-1, é o mais indicado para reverter a resistência à insulina dependente da HISS em ratos.

Por fim, constatou-se ainda que a inibição do guanilato ciclase hepático induziu resistência à insulina semelhante à observada após bloqueio da HISS, sugerindo que esta enzima está envolvido na modulação da sua síntese/secreção.

### **Considerações Metodológicas**

Um dos dadores de NO utilizados nesta série de experiências foi o nitroprussiato de sódio. Este fármaco tem uma semi-vida muito curta (Schulz, 1984), o que obrigou a que a sua administração fosse realizada de forma contínua ao longo de todo o RIST.

Está descrito que o SNP apresenta toxicidade, resultante da conversão do nitroprussiato em cianeto e tiocianato, sendo a LD<sub>50</sub> para ratos de 11 mg/kg (Yamamoto, 1992). Nas experiências realizadas neste trabalho a dose de SNP foi de 0.5 mg/kg, muito abaixo do valor de LD<sub>50</sub> supra-referido.

Observou-se que a dose de SIN-1 necessária para reverter a resistência à insulina induzida pela atropina 10 mg/kg foi mais elevada do que a dose utilizada para restaurar a acção da HISS após administração de L-NAME (5 mg/kg). Embora não se possa avançar uma explicação para este facto, é possível que a administração de atropina tenha provocado uma diminuição do nível basal de GMPc intracelular, tornando-se necessário administrar uma dose mais elevada de SIN-1 para repor os níveis intracelulares

de GMPc. Esta hipótese tem como base o facto de a atropina aumentar a concentração intracelular de AMPc, uma vez que bloqueia o tónus inibitório muscarínico no sistema do adenilato ciclase (Westlind-Danielsson *et al.*, 1990). O aumento dos níveis intracelulares de AMPc promove a estimulação de fosfodiesterases do GMPc através de *cross-talk* entre estes dois segundos mensageiros, resultando na diminuição dos níveis intracelulares de GMPc (Bellamy *et al.*, 2001). Estas premissas sustentam a hipótese de que a administração de atropina provocou um decréscimo na concentração basal de GMPc intracelular, sendo necessária uma dose mais elevada de SIN-1 para repor os níveis óptimos de GMPc necessários para a síntese da HISS.

Um outro aspecto crítico deste estudo prende-se com a utilização do fármaco AM para elucidar o papel do GC na acção da HISS. Devido à controvérsia na literatura em relação à especificidade deste fármaco para o GC, e uma vez que alguns autores sugeriam que o AM também possuía efeitos parassimpaticolíticos e antagonistas do NOS (Mayer *et al.*, 1993), seleccionou-se o ODQ por ser um inibidor do GC de elevada afinidade (Sobey *et al.*, 1997; Hwang *et al.*, 1998). Este fármaco foi administrado numa dose baixa por via intraportal, de forma a minimizar os seus efeitos sistémicos, permitindo a avaliação do papel do GC hepático na via de secreção da HISS.

### **Importância do NOS na secreção da HISS**

Comparando os RISTs obtidos após administração de L-NAME e após administração de atropina, conclui-se que estes dois fármacos diminuíram a sensibilidade à insulina com uma magnitude semelhante. Assim, o valor dos RISTs pós-L-NAME e pós-atropina sugere o bloqueio do mesmo efeito fisiológico por dois fármacos com mecanismos de acção distintos, suportando a hipótese de que a ACh e o NO fazem ambos parte da via de sinalização da HISS.

Observou-se que a administração intraportal do dador de NO, SIN-1, reverteu a resistência à insulina induzida pelo antagonista colinérgico. Por outro lado, a administração intraportal de ACh não normalizou a sensibilidade à insulina após antagonismo do NOS hepático, nem mesmo quando administrada numa dose duas vezes superior à necessária para restaurar a acção da HISS após ablação cirúrgica dos nervos parassimpáticos hepáticos (5 µg/kg/min) (Xie *et al.*, 1996a). O facto de a ACh, ao contrário do NO, não ter revertido a acção da HISS após bloqueio do NOS sugere o envolvimento do NOS na via de sinalização da HISS, a jusante dos receptores muscarínicos hepáticos. A análise dos perfis dinâmicos confirma que o SIN-1, administrado após atropina, originou um padrão de infusão de glucose semelhante ao padrão controlo, sugerindo que este fármaco restaurou a secreção hepática da HISS (figura 4.6).

### **O efeito vasodilatador do NO**

Um dos paradigmas vigentes acerca do papel do NO na sensibilidade à insulina tem a ver com o seu efeito vasodilatador. Foi proposto que a resistência à insulina induzida por bloqueio do NOS é secundária a uma redução na vasodilatação mediada pela insulina e, conseqüentemente, a uma redução no aporte de insulina e glucose ao músculo esquelético (Baron *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 2003). Esta teoria tem sido fortemente contestada por vários investigadores que defendem que o efeito vasodilatador da insulina só é observável em concentrações tão elevadas que se tornam claramente supra fisiológicas (Porter *et al.*, 1997). Estudos realizados por Scherrer *et al.* demonstraram que a infusão do antagonista do NOS, N-monometil-L-arginina (L-NMMA), na artéria braquial reduziu o fluxo sanguíneo no antebraço, sem no entanto alterar a captação de glucose (Scherrer *et al.*, 1994). Foi ainda descrito por outros investigadores que o aumento do fluxo sanguíneo promovido pela administração intra-arterial de SNP no antebraço de doentes obesos e hipertensos não aumentou a sensibilidade à insulina (Natali *et al.*, 1998).

Estas e outras observações mantêm acesa a controvérsia acerca da importância da vasodilatação regional na sensibilidade à insulina.

Neste trabalho não se observou qualquer efeito do dador de NO, SNP, na sensibilidade à insulina, apesar dos seus marcados efeitos vasodilatadores. Este resultado contradiz a hipótese de que o NO modula a sensibilidade à insulina exclusivamente devido a um efeito hemodinâmico. Observou-se ainda que, enquanto que a administração intraportal de SIN-1 reverteu a resistência à insulina induzida pelo antagonismo do NOS, a administração sistémica deste fármaco não produziu efeito na sensibilidade à insulina, embora os efeitos depressores da PAM fossem semelhantes e independentes do modo de administração. O efeito do NO na sensibilidade à insulina foi exclusivamente hepático e não se correlacionou com a acção vasodilatadora observada.

#### **Nem todos os dadores de NO conduzem à secreção da HISS**

O papel do NO hepático no controlo da sensibilidade periférica à insulina foi evidenciado pela primeira vez pelo trabalho de Sadri e Lautt em 1999. Estes autores observaram que a administração intraportal do antagonista do NOS, L-NMMA, reduziu significativamente a sensibilidade à insulina, comparativamente com a administração sistémica da mesma dose do fármaco. Verificaram ainda que, no estado pós-prandial, a resistência à insulina induzida por antagonismo do NOS foi revertida através da administração intraportal, mas não intravenosa, de SIN-1 (Sadri *et al.*, 1999). Estes resultados mostraram que a administração de SIN-1 no fígado estimulou a secreção da HISS, o que despertou o interesse para o potencial farmacológico dos dadores de NO no aumento da sensibilidade à insulina.

Neste trabalho testou-se a capacidade de diferentes dadores de NO reverterem a resistência à insulina induzida por inibição do NOS. Para tal, comparou-se o efeito do SIN-1 e do SNP, na reversão do bloqueio da HISS induzido pelo L-NAME, um dos mais potentes

inibidores estereoespecíficos da biosíntese de NO (Rees *et al.*, 1990). Os resultados obtidos mostraram que a capacidade de potenciação da acção da HISS dependeu do dador de NO utilizado. Assim observou-se que a administração intraportal de SIN-1 reverteu a inibição da HISS provocada pelo L-NAME, enquanto que a administração intraportal de SNP não o fez. Em contraste, a administração intravenosa de qualquer um dos dadores testados não reverteu a resistência à insulina induzida pelo antagonismo do NOS hepático, o que corrobora a hipótese de Sadri *et al.* de que o fígado é o órgão alvo para a potenciação da sensibilidade à insulina induzida pelo NO (Sadri *et al.*, 1999).

A análise dos perfis dinâmicos mostra que o SIN-1 administrado na veia porta originou um padrão de infusão de glucose semelhante ao padrão controlo, em que a via da HISS estava funcionando. A curva do perfil dinâmico após SIN-1 sugere que este fármaco restaurou a secreção hepática da HISS, previamente inibida por antagonismo do NOS (figura 4.3). Pelo contrário a administração intraportal do dador de NO, SNP, não reverteu a inibição da HISS induzida pelo antagonismo do NOS hepático. Aparentemente, a natureza química do dador de NO utilizado condicionou a sua capacidade de reversão da inibição da HISS induzida pelo L-NAME.

O SIN-1 é um derivado da molsidomina, que gera simultaneamente NO e radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) com uma estequiometria de 1:1 (Schrammel *et al.*, 1998). Embora a formação de radicais livres de oxigénio seja normalmente encarada como uma característica patológica, foi recentemente sugerido que a produção simultânea de NO e  $O_2^{\bullet-}$  é intrínseca à activação fisiológica do NOS (Mayer *et al.*, 1998; Schrammel *et al.*, 1998). O grupo de Mayer observou que o NOS não cataliza a formação de NO livre excepto na presença de concentrações elevadas de dismutase do superóxido (SOD), o enzima que neutraliza o radical  $O_2^{\bullet-}$  (Mayer *et al.*, 1998).

Os resultados de Mayer *et al.* foram confirmados por outros autores (Gow *et al.*, 1998; Stamler, 2003) o que levou ao reconhecimento, pela comunidade científica, de que a activação do NOS pode originar diferentes espécies químicas, conforme o meio



circundante. Assim se houver SOD presente, haverá formação de NO livre; se a actividade ou expressão do SOD forem reduzidas (como em casos de elevado stress oxidativo), haverá formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) por reacção do NO com  $\text{O}_2^\bullet$  e, por último, em sistemas ricos em GSH, a activação do NOS conduzirá preferencialmente à formação de S-nitrosoglutationo, por reacção do par  $\text{NO}/\text{O}_2^\bullet$  com o GSH. A formação de S-nitrosotióis é independente da activação do GC, embora possa conduzir à sua activação por transferência do NO do grupo tiol para o heme do GC (Mayer *et al.*, 1998; Schrammel *et al.*, 1998).

A intrigante observação de que o NOS produz  $\text{NO}/\text{O}_2^\bullet$ , em vez de NO livre, foi apresentada em 1998 por Mayer *et al.* como sendo uma estratégia fisiológica para prevenir a inibição do NOS pelo NO livre, através de um mecanismo de retroacção negativa. A verdade é que a produção intrínseca de  $\text{NO}/\text{O}_2^\bullet$  parece conferir ao NOS uma importante versatilidade de efeitos fisiológicos finais, que pode explicar a dualidade tão característica dos efeitos do NO: ora altamente benéfico, ora letal para o metabolismo celular.

Em função da sua descoberta, Mayer *et al.* propuseram que o SIN-1 é o dador de NO que melhor mimetiza a acção endógena do NOS.

O segundo dador de NO utilizado neste estudo foi o SNP. Este vasodilatador clássico, conhecido desde 1850 (Osswald, 2000), é um fármaco que liberta espontânea e exclusivamente NO. O seu mecanismo de acção não envolve a formação de  $\text{ONOO}^-$  ou de RSNOs, visto que a formação destas espécies requer a produção simultânea de NO e  $\text{O}_2^\bullet$  (Wink *et al.*, 1994; Hogg *et al.*, 1996; Gow *et al.*, 1998).

A administração de SNP não reverteu a inibição da sensibilidade à insulina induzida pelo antagonismo do NOS. Uma das hipóteses explicativas para este facto seria a inactivação do NO livre libertado pelo SNP pelo heme da hemoglobina plasmática (Feelisch *et al.*, 1987; Bates *et al.*, 1991), no entanto o acentuado efeito hipotensor observado após administração deste fármaco mostrou que o NO libertado estava

disponível para se ligar aos seus efectores (nomeadamente ao GC), apesar da sua elevada afinidade para a hemoglobina.

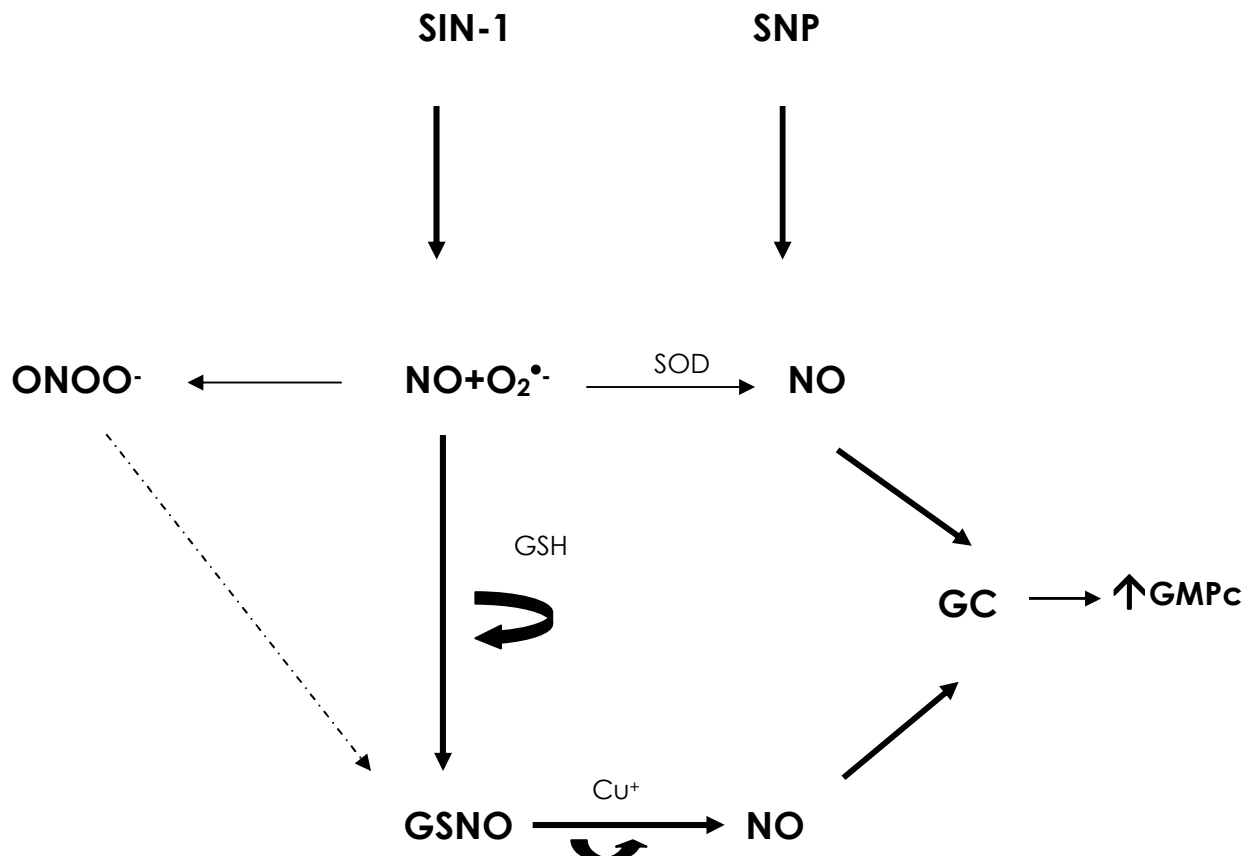
Como já foi referido, uma das principais diferenças entre o SIN-1 e o SNP passa pela sua capacidade de nitroação de tióis endógenos: o SIN-1 promove a formação de RSNOs enquanto que o SNP não. Os resultados obtidos apontam assim para o envolvimento de um tiol hepático, possivelmente o GSH, na sensibilidade à insulina mediada pela HISS. Está descrito que o fígado é um órgão que contém concentrações muito elevadas deste tiol não proteico (da ordem dos 0.3 mM (Modig, 1968), pelo que a administração intraportal de SIN-1 pode predispor à formação de GSNO, através do mecanismo supra-mencionado, enquanto que o SNP intraportal não nitrosa o GSH. O envolvimento do GSH na via que conduz à secreção da HISS é ainda suportado pelo facto da síntese deste tripéptido ser regulada pelo estado nutricional estando, tal como a HISS, elevado no estado pós-prandial imediato e diminuído no estado de jejum. O estudo do envolvimento do GSH hepático na sensibilidade à insulina mediada pelo fígado será abordado no próximo capítulo.

### **Envolvimento do guanilato ciclase na secreção da HISS**

Os RISTs efectuados após administração intraportal dos inibidores do GC, AM e ODQ inibiram a acção da insulina numa magnitude semelhante à observada após L-NAME e após atropina. Estes dados corroboram a hipótese de que o GMPc hepático é um dos efectores da via de sinalização da HISS.

Os resultados mostraram que tanto o ODQ como o AM induziram resistência à insulina quando administrados por via intraportal, mas não por via sistémica. Concluiu-se assim que o GC hepático está envolvido no controlo da sensibilidade à insulina, o que corrobora a hipótese de que a componente da acção da HISS depende da síntese de NO e GMPc no fígado, e não no músculo esquelético ou na vasculatura.

Embora o GC seja o efector clássico do NO, nem sempre a activação deste enzima é feita de forma directa pelo NO sintetizado pelo NOS (Mayer *et al.*, 1995). Está descrito que o NO pode reagir de forma reversível com o grupo heme da hemoglobina (Ferranti *et al.*, 1997) com grupos amina de proteínas, para formar N-nitrosotióis (Bryan *et al.*, 2004), ou ainda com grupos tiol de resíduos de cisteína para formar RSNOs (Stamler *et al.*, 2001). Foi recentemente descrito que os RSNOs podem activar o GC para estimular a síntese de GMPc (Mayer *et al.*, 1998), o que sugere que estas espécies químicas podem funcionar como intermediários entre a síntese de NO pelo NOS e a síntese de GMPc na via de secreção da HISS. A figura 4.10 procura resumir os mecanismos através dos quais o SIN-1 e o SNP libertam NO e possíveis interacções com o GSH e o GC.



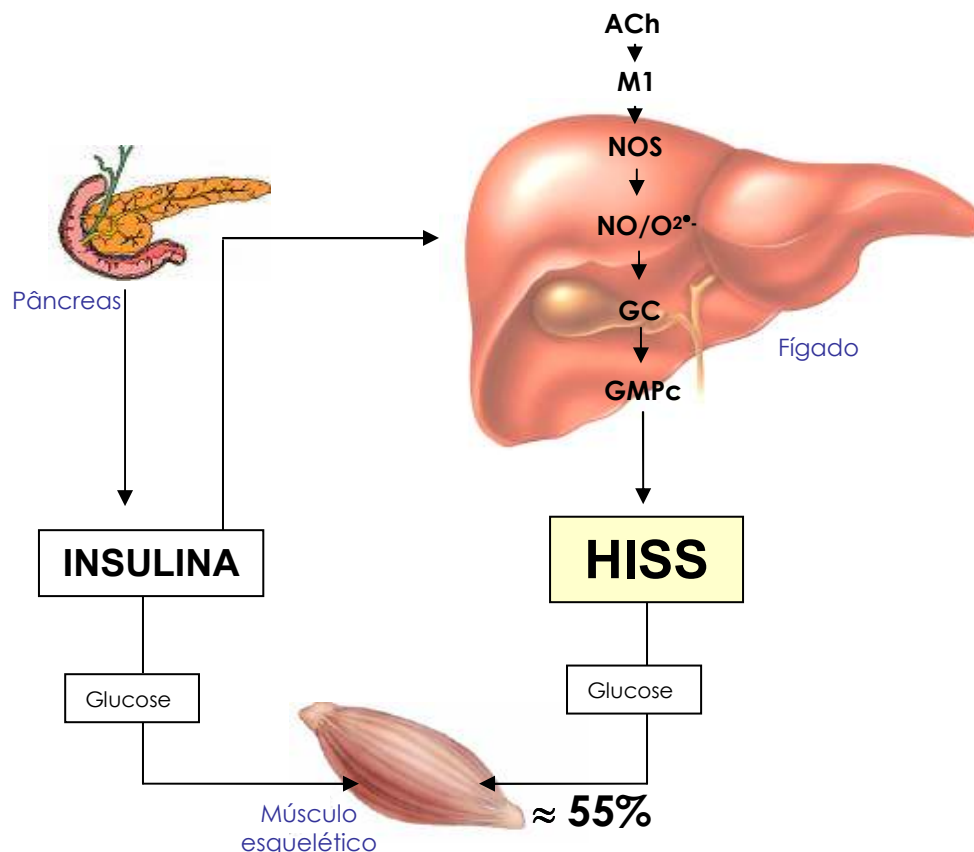
**Figura 4.10:** Vias possíveis para a activação do GC pelo par  $\text{NO}/\text{O}_2^{\bullet-}$ . Na ausência de dismutase do superóxido (SOD) e glutathione (GSH), o  $\text{NO}/\text{O}_2^{\bullet-}$  libertado pelo SIN-1 forma peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). A nitrosação do GSH pelo  $\text{ONOO}^-$  é um processo pouco eficiente (<1 %). A nitrosação do GSH pelo par  $\text{NO}/\text{O}_2^{\bullet-}$  é um processo bastante mais eficiente. A libertação de NO pelo GSNO é catalizada pelo cobre ( $\text{Cu}^+$ ) ou por enzimas. O NO livre liga-se com elevada afinidade ao guanilato ciclase, e aumenta o GMPc. Na presença de baixas concentrações de GSH, a SOD desvia a via no sentido da formação de NO livre e activação do GC. Figura adaptada de [Schrammel *et al.*, 1998].

Por outro lado, está descrito que os RSNOs também podem activar eventos celulares independentes do GC, através de reacções de transnitrosação, que consistem na transferência do grupo NO para resíduos de cisteína de outras proteínas (Hogg, 2002). O hipotético envolvimento de RSNOs na cascata de sinalização intracelular que conduz à

síntese da HISS é ainda suportado pelo facto de o SNP, ao contrário do SIN-1, não ter revertido a inibição da HISS induzida por antagonismo do NOS, uma vez que se sabe que o SIN-1 reage espontaneamente com grupos tiol enquanto que o SNP não.

Pela sua abundância nos hepatócitos, afinidade para reagir com o par  $\text{NO}/\text{O}_2^\bullet$ , e variação com o estado nutricional, o GSH hepático é um candidato natural a mediador da síntese/secreção da HISS.

Este conjunto de experiências permitiu deduzir que a libertação hepática da HISS ocorre em resposta à activação de receptores muscarínicos no fígado que por sua vez conduzem à activação do NOS, à produção de  $\text{NO}/\text{O}_2^\bullet$  e, posteriormente, à síntese de GMPc pelo enzima guanilato ciclase. Em função destes resultados, é apresentado na figura 4.11 um esquema simplificado que propõe uma hipótese para o mecanismo envolvido na síntese da HISS pelo fígado.



**Figura 4.11:** Mecanismo proposto para a via de sinalização que conduz à secreção da HISS pelo fígado. No estado pós-prandial, conjuntamente com a libertação de insulina pelo pâncreas, é iniciado um reflexo parassimpático hepático que resulta na libertação de acetilcolina (ACh) que activa os receptores muscarínicos do tipo M1 levando à produção de monóxido de azoto (NO) e radical anião superóxido  $O_2^{\bullet-}$  pelo NOS hepático. Este par activa posteriormente o guanilato ciclase através de um mecanismo ainda por esclarecer, levando a um aumento de GMPc no fígado e a subsequente libertação de HISS.

Os resultados obtidos corroboram ainda a hipótese de que a resistência à insulina subsequente à inibição do NOS está relacionada com efeitos hepáticos do NO e não com alterações no fluxo sanguíneo.

Observou-se ainda que o dador de NO/  $O_2^{\bullet-}$ , SIN-1, reverteu a inibição da HISS induzida pelo L-NAME, o que suporta a hipótese proposta por Mayer *et al.* em 1998 de que os produtos da activação NOS endógena são idênticos aos do SIN-1. O SNP não reverteu a

resistência à insulina induzida pelo L-NAME porque não mimetiza a actividade do NOS *in vivo*, nomeadamente no que respeita à capacidade de nitrosar tióis. Em função do mecanismo dos dois dadores de NO testados, concluiu-se que o SIN-1 deve ser o dador adoptado nos estudos relacionados com o papel do NOS na via da HISS.

## 5. O GLUTATIONO HEPÁTICO MODULA A ACÇÃO DA INSULINA

### 5.1. INTRODUÇÃO

A síntese/secreção da HISS pelo fígado ocorre em resposta à activação de receptores muscarínicos que, por sua vez, activam o NOS hepático e subsequentemente conduzem à síntese de GMPc.

Os resultados do capítulo anterior apontam ainda para o possível envolvimento de um tiol hepático na via de transdução de sinal da HISS, uma vez que a acção da HISS foi potenciada por dadores de NO que nitrosam tióis, mas não por dadores de NO que não reagem com grupos SH. Está descrito que o fígado é um órgão que contém concentrações muito elevadas do tiol não proteico GSH, um tripéptido regulado - tal como a HISS - pelo estado nutricional e que constitui um potencial candidato a mediador da sua síntese/ secreção.

A acção da insulina dependente da HISS é regulada pelo estado prandial, sendo máxima no estado pós-prandial imediato e mínima no estado de jejum. No entanto, a natureza do sinal prandial que controla a síntese da HISS é ainda desconhecida. Inicialmente considerou-se a hipótese de que a regulação da HISS pelo estado prandial dependia da actividade dos eferentes do ramo hepático do vago, uma vez que o tónus vagal aumenta durante a fase cefálica da resposta gastrointestinal às refeições e diminui no período de jejum (Lautt, 1983; Robertson *et al.*, 2002). Verificou-se, no entanto, que os nervos parassimpáticos hepáticos não constituíam o sinal prandial da secreção da HISS, uma vez que a administração intraportal de ACh não teve qualquer efeito na acção da insulina em animais em jejum (Lautt, observações não publicadas). Em função destes resultados, afastou-se também a hipótese de o sinal ser iniciado somente pelo NO, uma vez que a activação do NOS é um passo a jusante da síntese de ACh na via de sinalização da HISS, conforme discutido no capítulo 4.



Na tentativa de encontrar um candidato a sinal prandial para a síntese da HISS, surgiu como hipótese plausível o GSH, pela sua fina regulação pelo estado prandial e interação com o NO, tal como demonstrado no capítulo anterior.

A hipótese de que o GSH poderá estar envolvido na secreção da HISS é suportada pelo facto de vários autores referirem que os níveis de GSH estão diminuídos em várias patologias associadas à resistência à insulina, tais como a diabetes e a hipertensão (Vijayalingam *et al.*, 1996; Ewis *et al.*, 1997; Vaziri *et al.*, 2000; Martina *et al.*, 2001; Donmez *et al.*, 2002; Kennedy *et al.*, 2005), facto este que tem sido atribuído ao aumento do *stress* oxidativo que ocorre nestas doenças. Recentemente, Khamaisi *et al.* (2000) confirmaram que o GSH desempenha um papel fundamental na captação de glucose, para além do seu efeito antioxidante, quando descreveram que a depleção de GSH em ratos conduziu a intolerância à glucose, sem que houvesse aumento do *stress* oxidativo ou alterações na secreção de insulina.

No seu conjunto, todos estes resultados apontam para que o GSH, por si só, possa estar envolvido na patogénese da resistência à insulina através de mecanismos fisiopatológicos ainda desconhecidos, mas que são independentes das suas propriedades antioxidantes.

Neste capítulo testou-se a hipótese de que a diminuição do GSH hepático conduz a resistência à insulina através da inibição do mecanismo da HISS. Para isso induziu-se a depleção farmacológica do GSH utilizando a L-butionina sulfoximina (BSO), um inibidor do sintetase da  $\gamma$ -glutamilo-cisteína ( $\gamma$ -GCS), que é o enzima regulador da síntese do GSH. Procurou-se em seguida determinar se a componente da acção da insulina dependente da HISS estaria alterada nos animais tratados com BSO, através da administração intraportal de um inibidor do NOS. Por fim testou-se a capacidade de reversão da inibição induzida pelo antagonismo do NOS do dador de NO/  $O_2^{\bullet}$ , SIN-1, nos animais tratados com BSO.

## **5.2. PROTOCOLOS**

Os animais foram sujeitos a um jejum de 24 h, seguido de um período de 1 hora de livre acesso à comida, de forma a maximizar a acção da HISS. Desta forma, todos os protocolos foram realizados em animais no estado pós-prandial.

Foi realizado o procedimento cirúrgico tal como descrito no capítulo 3.3. Sempre que o protocolo requeria a infusão intraportal de fármacos cateterizou-se a veia porta. A sensibilidade à insulina foi avaliada utilizando o RIST, descrito previamente no capítulo 3.5. A temperatura corporal dos animais e os valores de pressão arterial média foram registados periodicamente durante as experiências.

No final das experiências foi quantificado o glutatono hepático dos animais, de acordo com o método descrito no capítulo 3.7.

## **5.3. RESULTADOS**

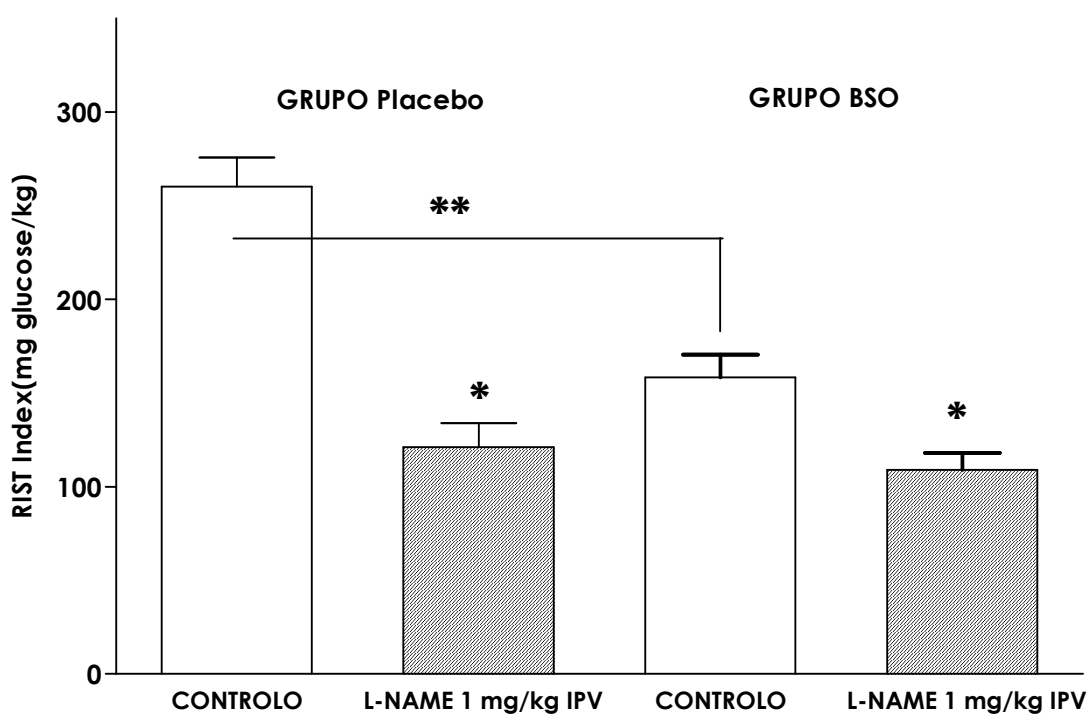
### **5.3.1. Efeito da depleção do glutatono hepático na sensibilidade à insulina.**

Com o intuito de avaliar o efeito da depleção de GSH na sensibilidade à insulina, administrou-se o inibidor do  $\gamma$ -GCS, BSO, a um grupo de ratos Wistar com 5 semanas de idade. A BSO foi dissolvida em NaCl 0.9 % e foi administrada por via intraperitoneal numa dose de 2 mmol/kg, diariamente, durante 20 dias, entre as 10 e as 12 h, conforme descrito previamente (Khamaisi *et al.*, 2000). O grupo placebo recebeu NaCl 0.9 % intraperitoneal durante o mesmo período de tempo.

Tanto no grupo BSO como no grupo placebo, foi efectuado um RIST controlo seguido de um RIST realizado 60 min após a administração de L-NAME (1 mg/kg) em bólus de 0.4 ml por via intraportal. Em seguida, administrou-se um bólus de 0.4 ml de SIN-1 (5 mg/kg),

também por via intraportal, e estabeleceu-se um segundo nível de glucose arterial basal. Realizou-se um terceiro RIST após administração de SIN-1.

O gráfico da figura 5.1 sintetiza os valores de RIST Index controlo e após administração de L-NAME tanto no grupo BSO como no grupo placebo.

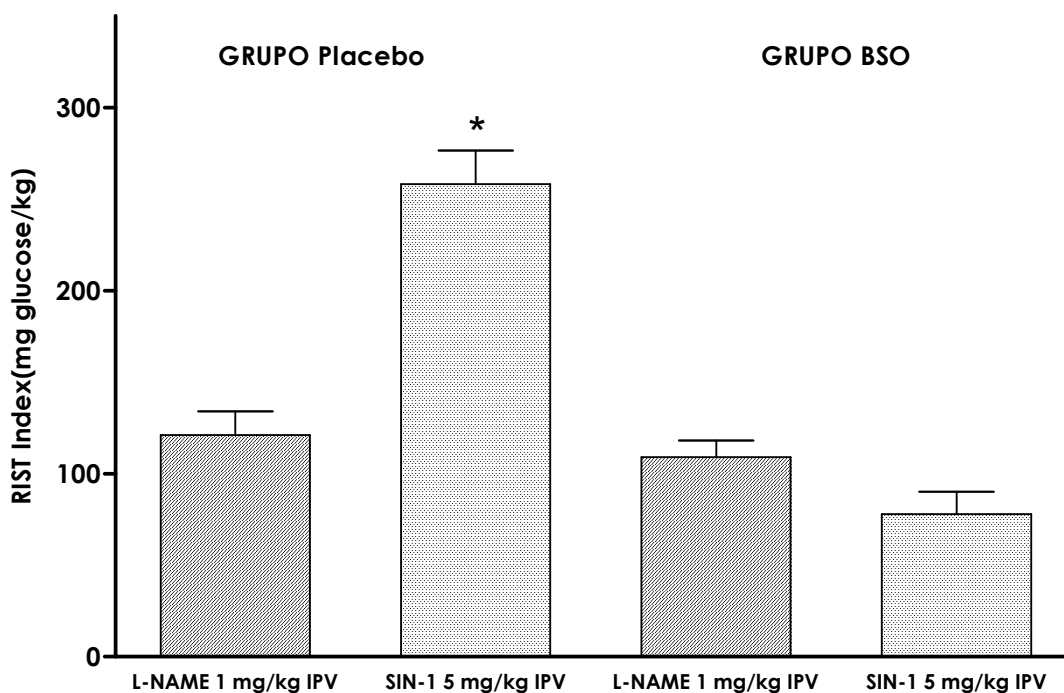


**Figura 5.1:** Valor dos RISTs controlo e após L-NAME nos grupos placebo (n=6) e grupo com o glutathione depletado (grupo BSO) (n=5). A inibição da síntese de GSH foi conseguida pela administração de L-butionina- [S,R]-sulfoximina (BSO), por via intraperitoneal, durante 20 dias. A BSO provocou um decréscimo de 39.1 % na acção total da insulina. A administração de L-NAME inibiu a acção da insulina em 52.3±5.8 % no grupo placebo e 26.6±2.5 % no grupo BSO. \*\*=p <0.01; \*= p < 0.05. Testes de Wilcoxon e de Mann-Whitney entre os dois grupos controlo.

Da figura é aparente que o RIST Index controlo nos animais tratados com BSO foi menor do que o RIST Index controlo no grupo placebo (BSO: 158.4±12.2 mg glucose/kg, n=5; Placebo: 260.2±15.6 mg glucose/kg, n=6; p <0.01). A administração de L-NAME reduziu a sensibilidade à insulina em ambos os grupos de animais testados, embora com

diferente magnitude: enquanto que no grupo BSO o RIST Index diminuiu de  $158.4 \pm 12.2$  para  $109.0 \pm 9.1$  mg glucose/kg ( $p < 0.05$ ,  $n=5$ ), no grupo placebo o RIST Index diminuiu de  $260.2 \pm 15.6$  para  $121.2 \pm 12.8$  mg glucose/kg ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ). As percentagens de inibição da sensibilidade à insulina após administração de L-NAME foram de  $26.6 \pm 2.5$  % no grupo BSO e de  $52.3 \pm 5.8$  % no grupo placebo ( $p < 0.01$ ).

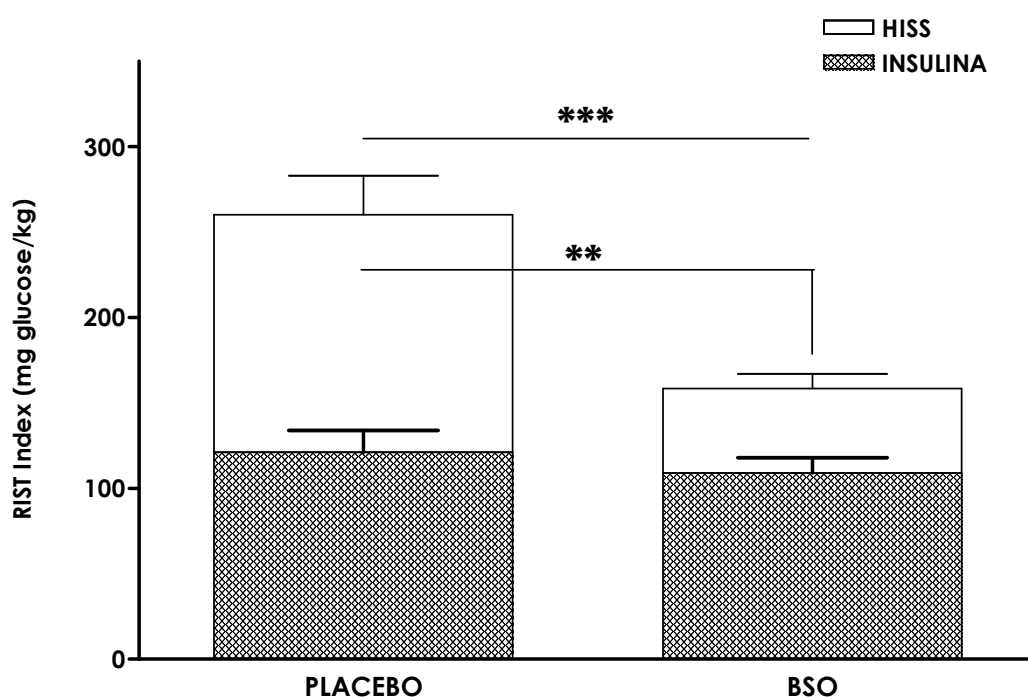
Como se pode observar na figura 5.2, no grupo BSO a administração intraportal de SIN-1 não reverteu a diminuição na sensibilidade à insulina provocada pelo L-NAME, uma vez que o RIST Index após-SIN-1 foi de  $77.8 \pm 12.4$  mg glucose/kg.



**Figura 5.2:** RISTs após L-NAME e após SIN-1 realizados no grupo placebo e no grupo de animais com o glutathione depletado (grupo BSO). No grupo placebo ( $n=6$ ), a resistência à insulina induzida pelo bloqueio do sintase do monóxido de azoto foi totalmente revertida pela administração de um dador de NO no fígado. No grupo BSO a administração do dador de NO, SIN-1 não reverteu a resistência à insulina induzida pelo L-NAME ( $n=5$ ), \* =  $p < 0.05$ . Teste de Wilcoxon.

Contudo, no grupo placebo, o SIN-1 reverteu totalmente o efeito inibitório do L-NAME na sensibilidade à insulina para valores próximos dos valores controlo ( $258.1 \pm 18.5$  mg glucose/kg,  $p < 0.05$  comparativamente ao RIST L-NAME).

A acção da HISS foi inibida através da administração intraportal do antagonista do NOS, L-NAME. Posteriormente, através da subtracção do RIST Index após L-NAME do valor de RIST Index controlo, calculou-se a componente da acção da insulina pela qual a HISS é responsável (Xie *et al.*, 1996a; Sadri *et al.*, 1999), o que permitiu comparar a integridade da via de acção da HISS nos animais tratados com BSO comparativamente com o grupo placebo, tal como representado na figura 5.3.



**Figura 5.3:** Acção total da insulina no grupo placebo e no grupo tratado com BSO com as componentes dependente e independente da HISS discriminadas. A administração de BSO provocou um decréscimo de 39.1 % na acção total da insulina,  $p < 0.001$ . A componente da insulina *per se* não se alterou no grupo tratado com BSO comparativamente ao grupo controlo. A componente dependente da HISS foi significativamente inibida no grupo BSO ( $49.3 \pm 8.56$  mg glucose/kg,  $n=6$ ) quando comparada com o grupo controlo ( $138.9 \pm 22.8$  mg glucose/kg,  $n=5$ ). Esta inibição foi de cerca de 64.4 %. \*\*\*= $p < 0.001$  \*\*= $p < 0.01$ ; ns= não significativo. Teste de Mann-Whitney.

O grupo em que o GSH hepático foi depletado com BSO apresentou um decréscimo de 39.1 % na sensibilidade à insulina comparativamente com o grupo placebo. Verifica-se que a acção da HISS foi de  $138.9 \pm 22.8$  mg glucose/kg no grupo placebo e apenas  $49.3 \pm 8.6$  mg glucose/kg no grupo BSO ( $p < 0.01$ ), o que corresponde a uma diminuição de acção da HISS de 64.4 % provocada pela depleção do GSH hepático com BSO. A componente da insulina per se não sofreu alterações.

### **5.3.2. Quantificação do glutatono hepático**

No final da experiência removeu-se o lóbulo médio do fígado dos animais para quantificação do GSH hepático, recorrendo ao método enzimático do peroxidase-reductase de Marinho *et al.*, (1997) descrito previamente no capítulo 3.7.

Observou-se que a concentração de GSH hepático estava diminuída no grupo de animais tratados com BSO. Os valores obtidos foram de  $5.9 \pm 0.4$   $\mu\text{mol/g}$  tecido no grupo controlo ( $n=6$ ) e de  $3.0 \pm 0.4$   $\mu\text{mol/g}$  tecido no grupo tratado com BSO ( $n=5$ ), o que corresponde a uma redução do GSH hepático de 49.2 % ( $p < 0.01$ , teste de Mann Whitney).

## **5.4. DISCUSSÃO**

O objectivo deste conjunto de experiências foi testar a hipótese de que o GSH hepático está envolvido na via de secreção da HISS e, consequentemente, na modulação da sensibilidade periférica à insulina.

Os resultados mostraram que a administração do inibidor da síntese de GSH, BSO, induziu resistência à insulina. Após a administração de L-NAME, o RIST Index foi semelhante nos grupos placebo e BSO, o que indica que a depleção de GSH inibiu apenas a componente da insulina dependente do NO hepático. Observou-se ainda que a

administração de SIN-1 não reverteu a resistência à insulina no grupo de animais tratado com BSO, ao contrário do grupo placebo.

Os resultados suportam a hipótese de que a resistência à insulina observada nos animais tratados com BSO foi devida à depleção de GSH hepático e à subsequente incapacidade de síntese da HISS pelo fígado. Assim, o GSH hepático constitui, juntamente com o NO, um passo crucial na regulação da acção da insulina dependente da HISS.

### **Considerações Metodológicas**

Um aspecto metodológico importante diz respeito à utilização do fármaco BSO como inibidor da síntese de GSH. Khamaisi *et al.* (2000) observaram que a inibição da síntese de GSH com BSO 2 mmol/kg administrada diariamente, durante 20 dias, diminuiu drasticamente os níveis tecidulares de GSH sem alterar parâmetros associados ao aumento de *stress* oxidativo, tais como a razão GSH/GSSG, os produtos resultantes da peroxidação lipídica ou a expressão proteica do transportador de glucose GLUT-4. Estes autores concluíram que a administração de BSO não provocou um aumento significativo do *stress* oxidativo, permitindo avaliar o efeito farmacológico da depleção de GSH sem mimetizar as complexas reacções associadas com a superprodução de radicais livres (Khamaisi *et al.*, 2000). Consequentemente, seleccionou-se a BSO para avaliar os efeitos do GSH independentes da sua acção antioxidante na sensibilidade à insulina.

### **O papel do glutathione hepático na resistência periférica à insulina**

Observou-se que a depleção farmacológica do GSH hepático diminuiu a sensibilidade periférica à insulina em 39.1 %.

Verificou-se ainda que no grupo placebo a administração de L-NAME reduziu drasticamente a sensibilidade à insulina ( $52.3 \pm 5.8$  %), enquanto que no grupo BSO o

antagonismo do NOS atenuou a sensibilidade à insulina em  $26.6 \pm 2.5$  %. Este resultado evidencia uma relação de causalidade entre a diminuição dos níveis de GSH hepático (49.2 %) e a inibição da componente da acção da insulina dependente da HISS (64.4 %) observada no grupo tratado com BSO, o que sugere que o mecanismo fisiopatológico responsável pela resistência à insulina nestes animais foi a inibição parcial da via da HISS.

O RIST Index após a administração de L-NAME foi semelhante nos grupos BSO e placebo, indicando que a acção da insulina independente da HISS se encontrava inalterada. Por fim, verificou-se que a administração de SIN-1 reverteu totalmente a resistência à insulina induzida pelo L-NAME apenas no grupo placebo, indicando que a presença de GSH no fígado é um requisito essencial para a síntese da HISS induzida pelo NO. Mais ainda, no grupo tratado com BSO, o RIST Index após SIN-1 mostrou uma ligeira tendência para diminuir, o que significa que a administração de SIN-1 a animais depletados de GSH, para além de não reverter a inibição da HISS, diminuiu a componente da acção da insulina *per se*. Na ausência de GSH, o SIN-1 forma ONOO<sup>-</sup>, uma espécie altamente oxidante que poderá ter exercido efeitos deletérios na acção da insulina independente da HISS. Está descrito que as espécies oxidantes de natureza semelhante ao ONOO<sup>-</sup> inibem a síntese de glicogénio (Blair *et al.*, 1999), diminuem a captação de glucose através de alterações na expressão e translocação do transportador de glucose GLUT-4 (Rudich *et al.*, 1999) podendo ainda bloquear a actividade de tirosina cinase da subunidade  $\beta$  do receptor de insulina (Hansen *et al.*, 1999).

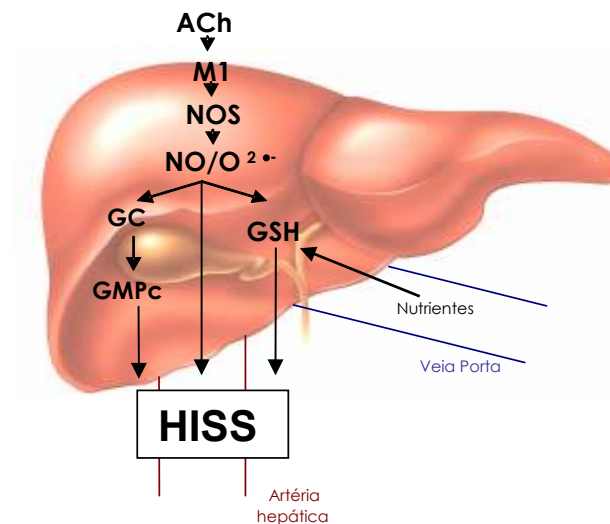
Os nossos resultados apontam para um novo paradigma na relação entre a resistência à insulina e o *stress* oxidativo. A hipótese clássica é a de que um aumento na produção de espécies radicalares conduz, simultaneamente, a uma diminuição dos níveis de GSH plasmático e a resistência à insulina pelos mecanismos supra-mencionados; no entanto os nossos resultados sugerem que a depleção do GSH hepático pode por si só diminuir a



sensibilidade à insulina, sem que haja aumento da produção de radicais livres (ver considerações metodológicas).

Os resultados indicam que a depleção de GSH inibiu a secreção da HISS, uma vez que a diminuição da sensibilidade à insulina, após antagonismo do NOS hepático, foi muito menor nos animais tratados com BSO do que no grupo placebo. Conclui-se que, no grupo BSO, a HISS estava inibida à partida pelo que o efeito inibitório do L-NAME na sensibilidade à insulina foi atenuado.

Esta hipótese é suportada pelas experiências de Khamaisi *et al.*, (2000) em que o mesmo protocolo experimental de depleção de GSH induziu intolerância à glucose em ratos. Estes autores verificaram que a tolerância diminuída à glucose observada não se podia atribuir a alterações na acção da insulina (avaliada pela captação de 2-desoxiglucose *in vitro*) nem na sua secreção pelo pâncreas; no entanto não foi proposto nenhum mecanismo para explicar os resultados obtidos. A hipótese da HISS não foi avaliada por estes investigadores, tendo sido apenas considerada a componente da acção da insulina independente da HISS, que não é alterada após administração de BSO, como foi confirmado nos resultados apresentados. Os nossos dados sugerem que a resistência à insulina observada nos animais tratados com BSO resultou da incapacidade de aumentar os níveis de GSH no estado pós-prandial, devido à inibição do  $\gamma$ -GCS o que, por sua vez, inibiu a libertação hepática da HISS. Apesar de o NO ser um potente activador da via da HISS, a administração de SIN-1 não aumentou a sensibilidade à insulina nos animais com GSH depletado, o que parece indicar a existência de dois mecanismos reguladores da síntese hepática da HISS: um mediado pelo NO e outro pelo GSH (figura 5.4).



**Figura 5.4:** Mecanismo proposto para a secreção da HISS pelo fígado. No estado pós-prandial o aumento de nutrientes no sangue portal conduz a um aumento nos níveis de glutatíono (GSH) hepático. Simultaneamente, é iniciado um reflexo parassimpático hepático que resulta na libertação de acetilcolina (ACh) que actua nos receptores muscarínicos do tipo M1 levando à produção de monóxido de azoto (NO) e radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pelo NOS hepático e subsequente activação do guanilato ciclase (GC). O GSH e o NO hepáticos são ambos fundamentais para a secreção da HISS pelo fígado.

O trabalho aqui apresentado salienta o importante papel do GSH na regulação da sensibilidade à insulina pelo estado prandial, sugerindo novas funções fisiológicas para este tripéptido, para além da sua acção antioxidante. Estes resultados suportam a hipótese de que o aumento da concentração hepática de GSH, que ocorre na transição do estado de jejum para o estado pós-prandial, participa no sinal que regula a libertação da HISS pelo fígado.

## **6. A CO-ADMINISTRAÇÃO DE UM DADOR DE GLUTATIONO E UM DADOR DE MONÓXIDO DE AZOTO NA VEIA PORTA AUMENTA A SENSIBILIDADE À INSULINA EM RATOS WISTAR EM JEJUM**

### **6.1. INTRODUÇÃO**

Os estudos descritos nos capítulos anteriores sugerem uma acção conjunta do GSH hepático e do NO hepático na síntese da HISS induzida pela ingestão de uma refeição, uma vez que se observou que tanto o bloqueio da síntese de GSH, como o antagonismo do NOS hepático mimetizaram, em ratos alimentados, a resistência à insulina observada no estado de jejum (ver capítulo 5.3.1.)

Os níveis de GSH e de NO estão diminuídos no fígado no estado de jejum, relativamente ao estado pós-prandial (Tateishi *et al.*, 1977; Grongnet *et al.*, 2003), o que corrobora a hipótese de que o GSH e o NO hepáticos são responsáveis pela modulação da sensibilidade à insulina pelo estado prandial.

Neste capítulo testou-se a hipótese de que a co-administração intraportal de GSH e de NO a ratos, submetidos a um período de jejum, mimetiza o sinal prandial para a síntese hepática da HISS, aumentando assim a sensibilidade à insulina para valores observados no estado pós-prandial.

A regulação do GSH hepático pelo estado nutricional prende-se essencialmente com a disponibilidade do aminoácido essencial cisteína. O GSH é sintetizado intracelularmente a partir dos seus aminoácidos constituintes: L-glutamato, L-cisteína e L-glicina. No fígado, tanto o glutamato como a glicina existem abundantemente no citosol, pelo que o passo limitante para a síntese de GSH é a disponibilidade de cisteína, que é obtida através da dieta ou da degradação de proteínas. Assim no estado de jejum, em que a disponibilidade de cisteína é baixa, a concentração de GSH hepático diminui enquanto

que no estado pós-prandial a concentração de cisteína no sangue portal aumenta e, consequentemente, o GSH hepático também aumenta. Uma vez que o GSH não é transportado de forma eficiente para dentro da maior parte das células animais (Anderson *et al.*, 1989), utilizou-se como dador de GSH o derivado éster monoetilo de glutathione (GSH-E), que atravessa as membranas celulares dos hepatócitos sendo convertido em GSH no citosol (Levy *et al.*, 1993).

Está também descrito que a expressão e actividade do NOS se encontra diminuída no tracto gastrointestinal após um período de 24 h de jejum, embora o mecanismo subjacente a esta inibição não se encontre totalmente esclarecido (Grongnet *et al.*, 2003). Uma vez que a síntese de NO hepático é essencial para a síntese da HISS, a diminuição da actividade do NOS no estado de jejum condiciona também a sua secreção. Assim, a mimetização do sinal prandial que aumenta a HISS passa também pelo aumento dos níveis hepáticos de NO através da administração de um dador de NO por via intraportal. Como o SIN-1 demonstrou ser o dador de NO mais eficaz na reversão da resistência à insulina induzida por antagonismo do NOS (ver capítulo 4.3.2.), foi este o fármaco escolhido para aumentar os níveis hepáticos de NO.

## **6.2. PROTOCOLOS**

Os animais foram sujeitos a um jejum de 24 h, de forma a inibir totalmente a acção da HISS. Foi realizado o procedimento cirúrgico tal como descrito no capítulo 3.3. Cateterizou-se a veia porta para permitir a perfusão intraportal de fármacos. A sensibilidade à insulina foi avaliada através do RIST, descrito no capítulo 3.5. A temperatura corporal dos animais e os valores de pressão arterial média foram registados periodicamente durante as experiências.

No final das experiências removeu-se o lóbulo médio do fígado dos animais para quantificação do GSH hepático de acordo com o método descrito no capítulo 3.7.

Utilizaram-se dois grupos de animais como controlos dos níveis de GSH hepático: um grupo de ratos no estado pós-prandial e um segundo grupo no estado de jejum.

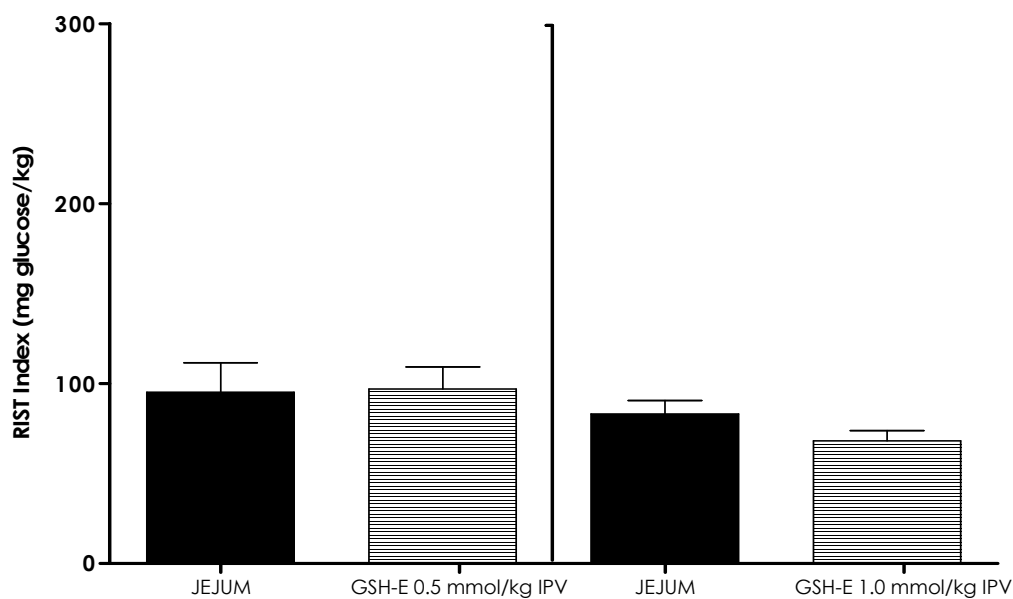
### **6.3. RESULTADOS**

#### **6.3.1. Efeito da administração intraportal de GSH-E na sensibilidade à insulina em animais em jejum**

Determinou-se o valor do RIST Index em animais submetidos a 24 h de jejum. Posteriormente administrou-se GSH-E numa dose de 0.5 mmol/kg ou 1.0 mmol/kg por via intraportal. O fármaco foi perfundido sob a forma de bólus de 0.4 ml, administrado ao longo de 10 min. Estas doses foram escolhidas porque aumentam significativamente os níveis de GSH hepático (Grattagliano *et al.*, 1995).

Após um período de estabilização de 60 min, foram recolhidas amostras de sangue de 5 em 5 min, até se obterem 3 valores estáveis de glicémia arterial. Realizou-se um novo RIST para avaliar o efeito do GSH-E na sensibilidade à insulina.

A administração de GSH-E nas doses testadas não alterou os valores de PAM nem a glicémia. O gráfico da figura 6.1 representa o efeito da administração intraportal do GSH-E no RIST Index, em duas doses diferentes.



**Figura 6.1:** A administração intraportal (ipv) de éster-monoetilo de glutatono (GSH-E) não alterou a sensibilidade à insulina em ratos Wistar em jejum, tanto na dose de 0.5 mmol/kg (n=5) como na dose de 1.0 mmol/kg (n=8), teste Wilcoxon.

Não se observaram alterações no valor do RIST Index após administração de GSH-E, tanto com a dose de 0.5 mmol/kg (de  $95.2 \pm 16.4$  mg glucose/kg para  $96.9 \pm 12.4$  mg glucose/kg, n=5), como com a dose de 1.0 mmol/kg (de  $83.1 \pm 7.5$  mg glucose/kg para  $68.1 \pm 5.7$  mg glucose/kg, n=8). O GSH-E 0.5 mmol/kg intraportal não alterou significativamente os níveis de GSH hepático ( $5.08 \pm 0.15$   $\mu$ mol/g tecido) em comparação com os níveis de GSH hepático no fígado de animais em jejum ( $4.26 \pm 0.41$   $\mu$ mol/g tecido). Em contraste, a administração intraportal de GSH-E 1 mmol/kg provocou um aumento do GSH hepático para  $7.24 \pm 0.39$   $\mu$ mol/g tecido, valor que é semelhante ao obtido para animais no estado pós-prandial ( $7.10 \pm 0.29$   $\mu$ mol/g tecido) (Tabela I).

**Tabela I:** Efeito da administração intraportal de diferentes doses de GSH-E nos níveis de GSH hepático de animais submetidos a 24 horas de jejum. A dose de 1.0 mmol/kg aumentou o GSH hepático para valores semelhantes aos observados no estado pós-prandial enquanto que a dose de 0.5 mmol/kg de GSH-E não alterou significativamente o GSH hepático, em relação ao estado de jejum. \*\*p <0.01 comparativamente ao pós-prandial, Kruskal-Wallis.

	<b>PÓS-PRANDIAL (n=8)</b>	<b>24h-JEJUM (n=8)</b>	<b>24h-JEJUM + GSH-E 0.5 mmol/kg IPV (n=5)</b>	<b>24h-JEJUM + GSH-E 1.0 mmol/kg IPV (n=8)</b>
<b>GSH Hepático (<math>\mu</math>mol/g tecido)</b>	7.10 $\pm$ 0.29	4.26 $\pm$ 0.41**	5.08 $\pm$ 0.15**	7.24 $\pm$ 0.39

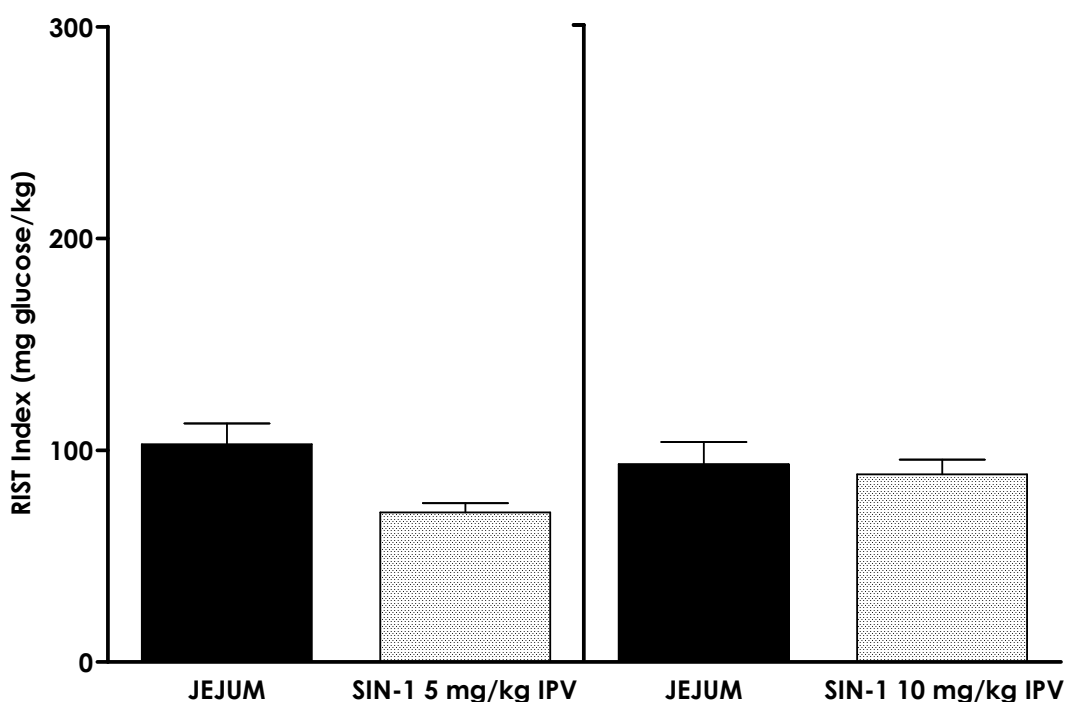
### **6.3.2. Efeito da administração intraportal de SIN-1 na sensibilidade à insulina em animais em jejum**

Realizou-se um RIST no estado de jejum seguido da administração intraportal do dador de NO, SIN-1, sob a forma de bólus de 0.4 ml. O SIN-1 foi administrado nas doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg. Estas doses de SIN-1 foram escolhidas com base na sua capacidade de reverter a resistência à insulina induzida pelo antagonismo dos receptores muscarínicos (ver resultados 4.3.3) ou pela inibição do NOS hepático (ver resultados 4.3.2). Ao fim de 60 min após a perfusão do fármaco realizou-se um novo RIST.

A PAM diminuiu de forma semelhante após o SIN-1 5 mg/kg (de 105.0 $\pm$ 15.0 mmHg para 65.0 $\pm$ 5.0 mmHg, p <0.001, n=6) e o SIN-1 10 mg/kg (de 114.9 $\pm$ 8.0 mmHg para 68.6 $\pm$ 7.4 mmHg, p <0.001, n=5). Apesar do decréscimo inicial induzido pelo fármaco, os

valores de PAM mantiveram-se constantes durante o RIST. A glicemia variou de forma semelhante após SIN-1 5 mg/kg (de  $95.3 \pm 3.0$  mg/ml para  $108.4 \pm 2.4$  mg/ml,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) e após SIN-1 10 mg/kg ( $97.4 \pm 5.4$  mg/ml para  $110.6 \pm 1.7$  mg/ml,  $p < 0.05$ ,  $n=5$ ).

Os resultados relativos ao efeito da administração intraportal do dador de NO, SIN-1, na sensibilidade à insulina estão representados graficamente na figura 6.2.



**Figura 6.2:** A administração intraportal (ipv) do dador de NO, SIN-1, não alterou a sensibilidade à insulina em ratos Wistar em jejum, tanto na dose de 5 mg/kg ( $n=6$ ) como na dose de 10 mg/kg ( $n=5$ ), Kruskal-Wallis.

A dose de SIN-1 de 5 mg/kg não alterou significativamente a sensibilidade à insulina relativamente ao estado de jejum. O RIST Index foi de  $98.4 \pm 10.6$  mg glucose/kg e  $69.4 \pm 5.2$  mg glucose/kg antes e depois da administração do fármaco, respectivamente ( $n=6$ ). A dose de 10 mg/kg de SIN-1 também não alterou a sensibilidade à insulina, uma vez que o RIST Index foi de  $88.7 \pm 6.9$  mg glucose/kg ( $n=5$ ).



Não se observaram alterações nos níveis de GSH hepático após administração de SIN-1 em nenhuma das doses testadas, comparativamente ao estado de jejum (de  $5.25 \pm 0.15 \mu\text{mol/g}$  tecido para  $5.34 \pm 0.08 \mu\text{mol/g}$  tecido, para a dose mais elevada de SIN-1 (Tabela II).

**Tabela II:** Efeito da administração intraportal de diferentes doses de SIN-1 nos níveis de GSH hepático de animais em jejum de 24 horas. O SIN-1 não alterou os valores de GSH hepático em nenhuma das doses testadas. \*\*p <0.01 comparativamente ao estado pós-prandial, Kruskal-Wallis.

	<b>PÓS-PRANDIAL (n=8)</b>	<b>24h-JEJUM (n=6)</b>	<b>24h-JEJUM + SIN1 5 mg/kg IPV (n=6)</b>	<b>24h-JEJUM + SIN1 10 mg/kg IPV (n=5)</b>
<b>GSH Hepático (<math>\mu\text{mol/g}</math> tecido)</b>	7.10 $\pm$ 0.29	5.25 $\pm$ 0.15**	5.20 $\pm$ 0.16**	5.34 $\pm$ 0.08**

### 6.3.3. Efeito da administração combinada de SIN-1 e GSH-E na sensibilidade à insulina em animais em jejum

#### 6.3.3.1. Estudos de dose e via de administração do SIN-1

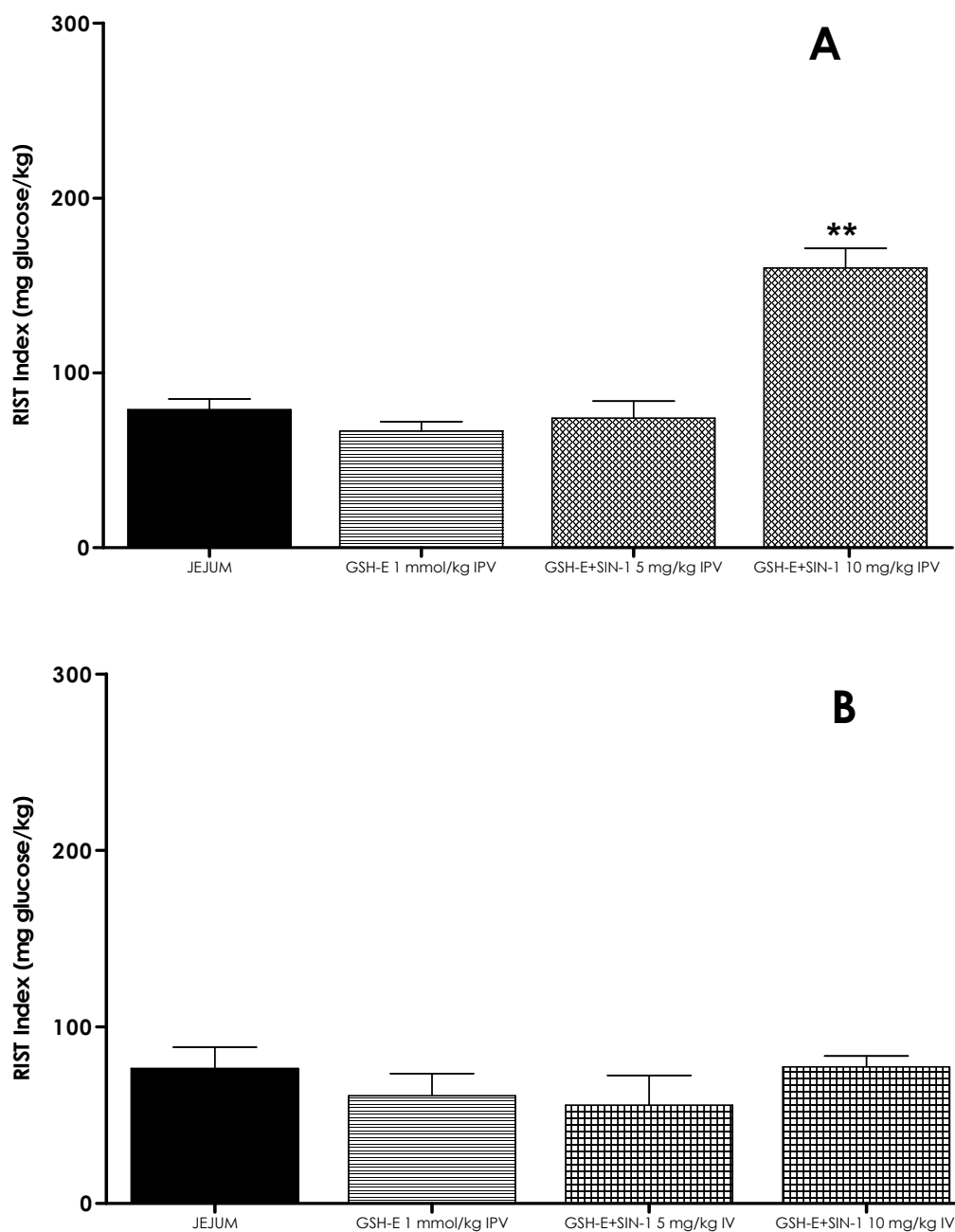
Nesta série de experiências, testou-se o efeito sensibilizador da insulina da co-administração de GSH-E e de SIN-1. Para isto foram utilizadas duas doses diferentes de SIN-1 administradas quer por via sistêmica, quer por via intraportal. A dose de GSH-E utilizada foi 1 mmol/kg intraportal, uma vez que foi esta a dose necessária para elevar os

níveis de GSH hepático para valores correspondentes ao estado pós-prandial (ver Tabela I, resultados 6.3.1.).

Realizou-se um RIST no estado de jejum seguido de um segundo RIST após perfusão intraportal de GSH-E 1 mmol/kg. Após um período de estabilização de 60 min, administrou-se SIN-1 por via intraportal numa dose de 5 mg/kg ou de 10 mg/kg e realizou-se um novo RIST. Num segundo grupo de animais, e para testar a natureza hepática do efeito observado, realizaram-se experiências controlo em que o SIN-1 foi administrado por via intravenosa tanto na dose de 5 mg/kg como na dose de 10 mg/kg.

A PAM diminuiu após administração intraportal de SIN-1: de  $120.0 \pm 4.7$  mmHg para  $61.5 \pm 4.3$  mmHg para a dose de 5 mg/kg ( $p < 0.001$ ,  $n=5$ ) e para  $59.8 \pm 5.9$  mmHg com a dose de 10 mg/kg ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ ). A administração intravenosa de SIN-1 induziu um decréscimo na PAM semelhante ao observado com a administração intraportal: de  $129.0 \pm 3.0$  mmHg para  $65.9 \pm 4.6$  mmHg após a dose de 5 mg/kg ( $p < 0.01$ ,  $n=3$ ) e para  $63.1 \pm 3.8$  mmHg após a dose de 10 mg/kg ( $p < 0.01$ ,  $n=5$ ).

A figura 6.3 resume os resultados das experiências desenhadas para avaliar o efeito da dose e via de administração do SIN-1 na sensibilidade à insulina em ratos em jejum, quando co-administrado com GSH-E 1 mmol/kg intraportal.



**Figura 6.3: A)** RIST no estado de jejum seguido de RIST após GSH-E 1 mmol/kg intraportal e após SIN-1 intraportal dose de 5 mg/kg (n=5) e 10 mg/kg (n=6). O SIN-1 10 mg/kg intraportal após GSH-E 1 mmol/kg intraportal aumentou significativamente a sensibilidade à insulina. Teste de Kruskal-Wallis,  $p<0.001$ . Teste de Dunns em relação ao jejum, \*\*  $p<0.01$ . **B)** RIST no estado de jejum seguido de RIST após GSH-E 1 mmol/kg intraportal e após SIN-1 intravenoso dose de 5 mg/kg (n=3) e 10 mg/kg (n=5). O SIN-1 intravenoso após GSH-E intraportal não alterou a sensibilidade à insulina.

Na série de experiências em que o SIN-1 foi administrado por via intraportal, observou-se que o RIST Index em jejum foi de  $79.1 \pm 6.0$  mg glucose/kg. Após GSH-E, o RIST Index foi de  $66.8 \pm 5.4$  mg glucose/kg e a administração de SIN-1 5 mg/kg ipv não alterou significativamente a sensibilidade à insulina ( $74.2 \pm 9.6$  mg glucose/kg),  $n=5$ . A administração de SIN-1 10 mg/kg ipv potenciou a sensibilidade à insulina nestes animais, sendo o RIST Index de  $159.9 \pm 11.4$  mg glucose/kg,  $p < 0.01$  em relação ao RIST Index em jejum,  $n=6$ , figura 6.3A.

A administração de SIN-1 por via intravenosa após GSH-E 1 mmol/kg intraportal não alterou a sensibilidade à insulina em qualquer das doses testadas. O RIST Index foi de  $76.5 \pm 12.0$  mg glucose/kg em jejum, foi de  $60.9 \pm 12.7$  mg glucose/kg após GSH-E e foi de  $55.8 \pm 16.7$  mg glucose/kg após SIN-1 5 mg/kg iv ( $n=3$ ). Após SIN-1 10 mg/kg iv o RIST Index foi  $77.3 \pm 6.2$  mg glucose/kg,  $n=5$ , figura 6.3B.

#### **6.3.3.2. Estudos de dose e via de administração do GSH-E**

Nesta série de experiências, procurou-se determinar se a potenciação da sensibilidade à insulina observada após co-administração de GSH-E e SIN-1 dependia da dose de GSH-E e da via de administração do fármaco.

Assim, no primeiro grupo de animais realizou-se um RIST no estado de jejum seguido da administração intraportal de GSH-E em diferentes doses: 0.1; 0.25; 0.5; 1.0 e 2.0 mmol/kg. Após um período de 60 min de estabilização, administrou-se SIN-1 10 mg/kg por via intraportal e realizou-se um novo RIST.

Num segundo grupo de animais realizou-se um RIST no estado de jejum seguido da administração intravenosa de GSH-E nas mesmas doses administradas anteriormente: 0.1; 0.25; 0.5; 1.0 e 2.0 mmol/kg. Após um período de 60 min de estabilização, administrou-se SIN-1 10 mg/kg por via intraportal e realizou-se um novo RIST.

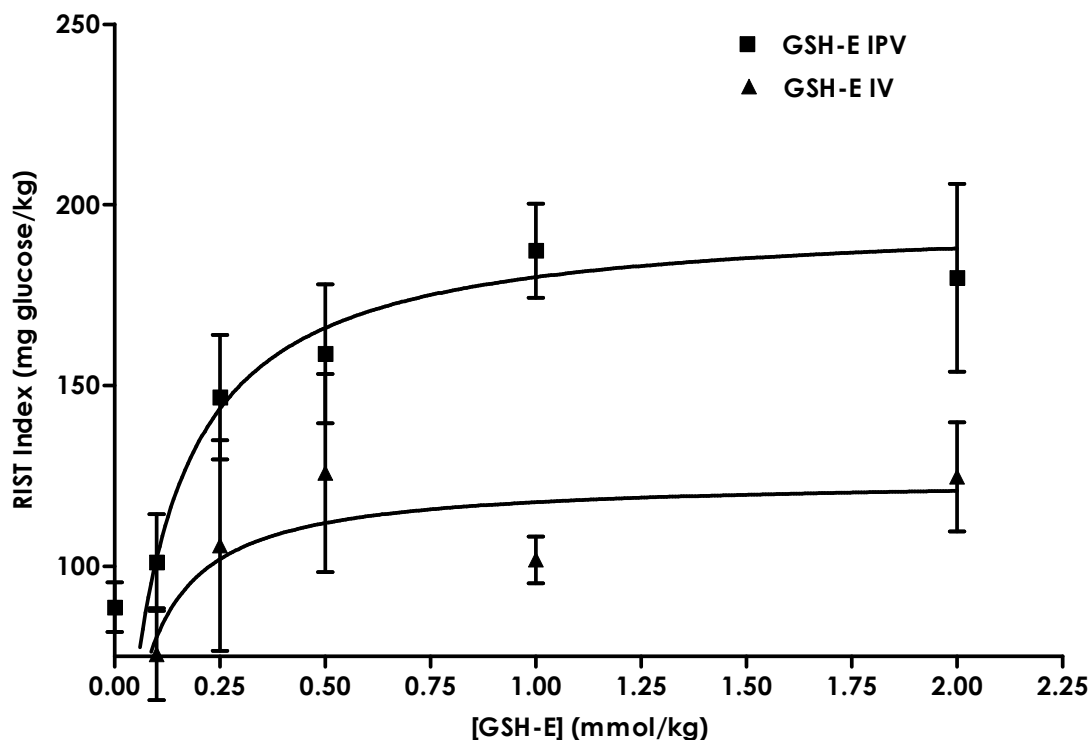
No grupo em que o GSH-E foi administrado por via intraportal, seguido de SIN-1 ipv, constatou-se que a sensibilidade à insulina aumentou após administração conjunta dos fármacos e que este aumento foi dependente da dose de GSH-E administrado: de  $82.4 \pm 6.6$  para  $101.1 \pm 13.4$  mg glucose/kg para GSH-E 0.1 mmol/kg, correspondendo a um aumento de  $26.1 \pm 9.4$  % (n=4); de  $89.1 \pm 18.5$  para  $146.8 \pm 17.2$  mg glucose/kg para a dose de 0.25 mmol/kg, correspondendo a um aumento de  $44.6 \pm 7.9$  % (n=4); de  $95.2 \pm 16.4$  para  $158.8 \pm 19.2$  mg glucose/kg para a dose de 0.5 mmol/kg, correspondendo a um aumento de  $59.4 \pm 15.1$  % (n=5); de  $83.1 \pm 7.5$  para  $187.3 \pm 13.0$  mg glucose/kg para a dose de 1 mmol/kg, correspondendo a um aumento de  $138.9 \pm 12.7$  % (n=8) e, finalmente, de  $76.4 \pm 15.6$  para  $179.9 \pm 26.0$  mg glucose/kg para a dose de 2 mmol/kg, correspondendo a um aumento de  $117.3 \pm 29.2$  %. Teste de Kruskal-Wallis, n=4, p <0.05 (Tabela III).

**Tabela III:** Valores dos RIST Index no estado de jejum e após co-administração intraportal de diferentes doses de GSH-E e SIN-1 10 mg/kg. O aumento que se observou na sensibilidade à insulina após co-administração de GSH-E e de SIN-1 foi dependente da dose de GSH-E administrada aumento. \*p <0.05, \*\*p <0.01; Teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunns.

	Dose de GSH-E IPV (mmol/kg)				
	0.1 (n=4)	0.25 (n=4)	0.5 (n=5)	1.0 (n=8)	2.0 (n=4)
<b>RIST JEJUM</b>	$82.4 \pm 6.6$	$89.1 \pm 18.5$	$95.2 \pm 16.4$	$83.1 \pm 7.5$	$76.4 \pm 15.6$
<b>RIST GSH-E + SIN-1</b>	$101.1 \pm 13.4$	$146.8 \pm 17.2$	$158.8 \pm 19.2$	$187.3 \pm 13.0^*$	$179.9 \pm 26.0^{**}$
<b>% aumento</b>	$26.1 \pm 9.4\%$	$44.6 \pm 7.9\%$	$59.4 \pm 15.1\%$	$138.9 \pm 12.7\%^*$	$117.3 \pm 29.2\%^{**}$

No segundo grupo de animais o GSH-E foi administrado em diferentes doses por via sistêmica, seguido de SIN-1 10 mg/kg intraportal. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas, mesmo com a dose mais elevada de GSH-E testada: de  $74.9 \pm 3.0$  para  $75.6 \pm 12.8$  mg glucose/kg para a dose de GSH-E de 0.1 mmol/kg (n=3); de  $86.8 \pm 14.9$  para  $105.7 \pm 29.1$  mg glucose/kg para a dose de 0.25 mmol/kg (n=3); de  $94.9 \pm 9.3$  para  $99.2 \pm 11.8$  mg glucose/kg para a dose de 0.5 mmol/kg (n=3); de  $93.8 \pm 3.3$  para  $105.6 \pm 9.0$  mg glucose/kg para a dose de 1 mmol/kg (n=3) e de  $105.4 \pm 6.6$  para  $124.8 \pm 15.1$  mg glucose/kg para a dose de 2 mmol/kg (n=3). A PAM diminuiu após a administração de SIN-1 independentemente da dose de GSH-E administrada e da via de administração do fármaco. Não houve diferenças estatisticamente significativas na PAM dos vários grupos de animais testados.

A figura 6.4 representa a curva dose-resposta para a dose de GSH-E versus RIST Index após SIN-1 tanto para a administração intraportal como para a administração intravenosa de GSH-E.



**Figura 6.4:** RIST Index após SIN-1 em função da dose de GSH-E administrada por via sistêmica, n=12 (▲) ou intraportal, n=23 (■). A sensibilidade à insulina depende da dose de GSH-E administrado e observou-se que o GSH-E é mais potente e mais eficaz quando administrado por via intraportal do que por via intravenosa. GSH-E ipv:  $ED_{50}=0.278\pm0.10$  mmol/kg e  $E_{max}=191.4\pm 11.2$  mg glucose/kg. GSH-E ivp:  $ED_{50}=0.240\pm0.16$  e  $E_{max}=116.5\pm12.2$  mg glucose/kg.

No caso da administração intraportal de GSH-E, a  $ED_{50}$  foi de  $0.278\pm0.10$  mmol/kg e o  $E_{max}$  foi de  $191.4\pm11.2$  mg glucose/kg ( $R^2=0.5517$ ). No caso da administração intravenosa de GSH-E, a  $ED_{50}$  foi de  $0.240\pm0.16$  mmol/kg e o  $E_{max}$  foi de  $116.5\pm12.2$  mg glucose/kg ( $R^2=0.243$ ).

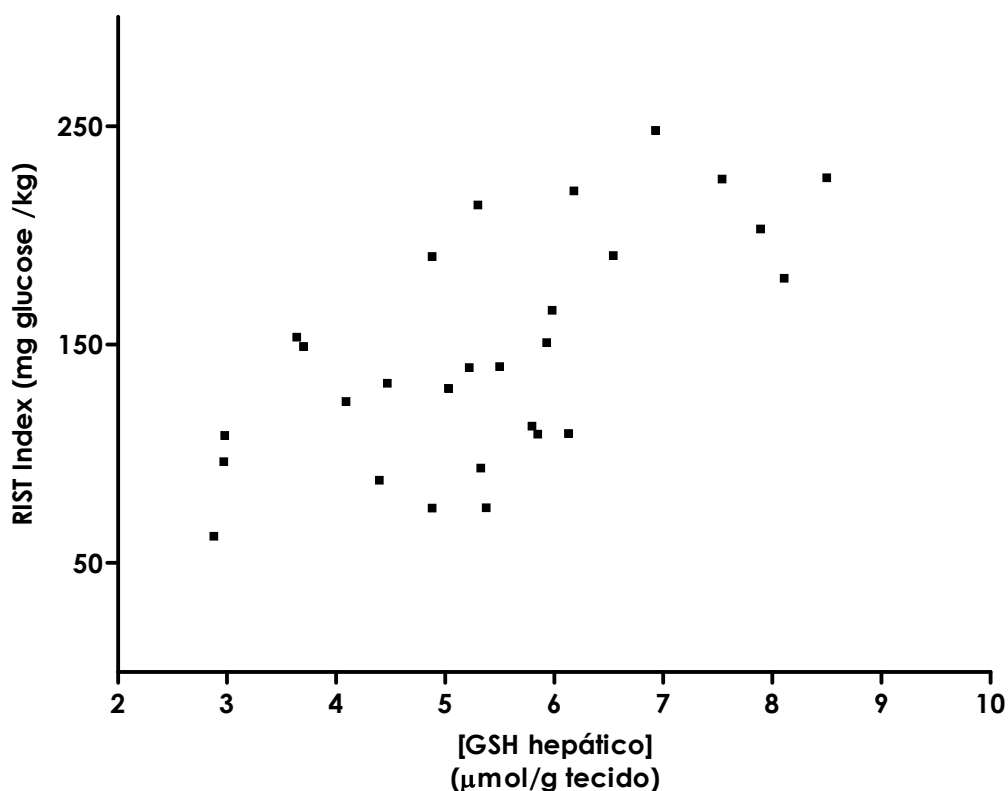
Tal como esperado, observou-se um aumento nos níveis de GSH hepático dependente da dose de GSH-E intraportal administrado (Tabela IV).

**Tabela IV:** Valores de GSH hepático após administração intraportal de GSH-E, seguido de SIN-1 10 mg/kg intraportal. \*p <0.05, \*\*p<0.01; Teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunns.

	GSH-E 0.1 mmol/kg + SIN-1 10 mg/kg (n=4)	GSH-E 0.25 mmol/kg + SIN-1 10 mg/kg (n=4)	GSH-E 0.5 mmol/kg + SIN-1 10mg/kg (n=5)	GSH-E 1.0 mmol/kg + SIN-1 10mg/kg (n=8)	GSH-E 2.0 mmol/kg + SIN-1 10mg/kg (n=4)
<b>GSH Hepático (<math>\mu</math>mol/g tecido)</b>	3.80 $\pm$ 1.11*	4.20 $\pm$ 0.91	4.30 $\pm$ 0.42	7.20 $\pm$ 0.40**	6.13 $\pm$ 0.36*

Representando graficamente os valores de RIST Index após co-administração de GSH-E e SIN-1 em função dos níveis de GSH hepático quantificados no final de cada experiência constata-se que existe uma tendência para um aumento da sensibilidade à insulina nos animais que apresentaram valores de GSH mais elevados no fígado (figura 6.5).





**Figura 6.5:** RIST Index após co-administração de GSH-E e SIN-1 em função da concentração de GSH hepático medida no final de cada experiência. De uma maneira geral, os ratos que apresentaram maior sensibilidade à insulina após a administração dos fármacos foram aqueles em que se observou maior concentração de GSH no fígado.

#### 6.4. DISCUSSÃO

O objectivo deste conjunto de experiências foi testar a hipótese de que o sinal prandial que conduz à secreção da HISS é modulado pelo aumento dos níveis de GSH e de NO hepático que ocorre imediatamente após uma refeição.

Neste capítulo observou-se que a co-administração de GSH e de NO a ratos em jejum, por via intraportal, mimetizou o efeito sensibilizador da insulina induzido pela secreção da HISS no estado pós-prandial. Verificou-se também que a potenciação da sensibilidade à

insulina foi dependente das doses de GSH e de NO administrado ao fígado. Constatou-se ainda que existe uma correlação entre os níveis de GSH, quantificados no fígado dos animais, e o aumento da sensibilidade à insulina induzido por co-administração de um dador de GSH com um dador de NO.

#### **A administração isolada de NO não altera a sensibilidade à insulina**

O efeito do NO na sensibilidade à insulina tem sido extensivamente estudado (Baron, 1996; Young *et al.*, 1998; Scherrer *et al.*, 2000; Steinberg *et al.*, 2000; Lutt, 2004). Uma das hipóteses, discutida no capítulo anterior (capítulo 5.4), propõe que o NO aumenta a sensibilidade à insulina devido às suas propriedades vasodilatadoras através do aumento do aporte de insulina e glucose aos tecidos alvo (Baron *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 2003). Mais uma vez, os resultados obtidos contrariam essa hipótese. Observou-se que, apesar dos seus efeitos hemodinâmicos, o SIN-1 só aumentou a sensibilidade à insulina quando administrado por via intraportal e apenas na presença de níveis elevados de GSH. Verificou-se também que, após reposição dos níveis de GSH hepático para valores pós-prandiais, o efeito do SIN-1 na sensibilidade à insulina foi dependente da dose perfundida, tendo-se observado uma eficácia máxima com a dose de 10 mg/kg.

#### **O glutatono hepático modula a sensibilidade periférica à insulina**

Resultados de outros investigadores sugerem que a administração de GSH aumenta a sensibilidade à insulina através da sua acção antioxidante (Paolisso *et al.*, 1992b; De Mattia *et al.*, 1998). Foram já propostos diversos mecanismos pelos quais o aumento do stress oxidativo deteriora a sinalização do receptor da insulina, nomeadamente alterações na actividade de tirosina cinase do receptor (Hansen *et al.*, 1999) e alterações na expressão e translocação dos transportadores de glucose GLUT-4 (Tirosh *et al.*, 2000)

entre outros. De Mattia e Paolisso propuseram que o aumento da sensibilidade à insulina observado em diabéticos, após administração de GSH, foi devido à captação de radicais livres pelo fármaco, o que diminuiu os efeitos deletérios do *stress* oxidativo na acção da insulina no seu receptor (Paolisso *et al.*, 1992b; De Mattia *et al.*, 1998). Em contraste, indivíduos normais pareceram não beneficiar da infusão de GSH, o que indica que este fármaco só potencia a sensibilidade à insulina em casos em que o *stress* oxidativo esteja significativamente aumentado.

Esses resultados vão de encontro ao que se observou nestes estudos, uma vez que a administração isolada de GSH-E a ratos Wistar em jejum não aumentou a sensibilidade à insulina. Não se conhecem alterações ao nível do receptor da insulina nem aumento dos índices de *stress* oxidativo neste modelo animal, o que minimizou o potencial efeito antioxidante do GSH na acção da insulina.

Enquanto que o GSH por si só não alterou a captação total de glucose, a sua co-administração intraportal com o dador de NO, SIN-1, potenciou significativamente o efeito hipoglicemiante da insulina nos ratos em jejum. O incremento observado na sensibilidade à insulina atingiu um máximo após a administração de GSH-E intraportal numa dose de 1 mmol/kg, seguido de SIN-1 intraportal numa dose de 10 mg/kg, sendo que 1 mmol/kg de GSH-E foi a dose mínima necessária para repor os valores de GSH hepático em níveis equivalentes ao estado pós-prandial (ver tabela I). Foi necessário aumentar a concentração intracelular de GSH nos hepatócitos para que a administração de NO ao fígado fosse eficaz no aumento da sensibilidade à insulina. Observou-se também uma correlação entre os níveis de GSH hepático e a potenciação da sensibilidade à insulina induzida pelo SIN-1.

Está descrito que após uma refeição aumentam os níveis de GSH hepático (Tateishi *et al.*, 1977; Meister, 1995) e a síntese de NO no fígado (Grongnet *et al.*, 2003). A variação que ocorre na concentração destas duas espécies químicas pode, no seu conjunto, ser o sinal prandial que modula a síntese da HISS. De acordo com esta hipótese, o jejum, o

aumento do *stress* oxidativo, a diminuição da actividade do NOS, a neuropatia hepática e qualquer outro processo que diminua os níveis de GSH e/ou de NO conduz a resistência à insulina dependente do mecanismo da HISS. De acordo com os resultados deste trabalho, a reposição do GSH e do NO hepático para valores controlo deverá normalizar a sensibilidade à insulina.

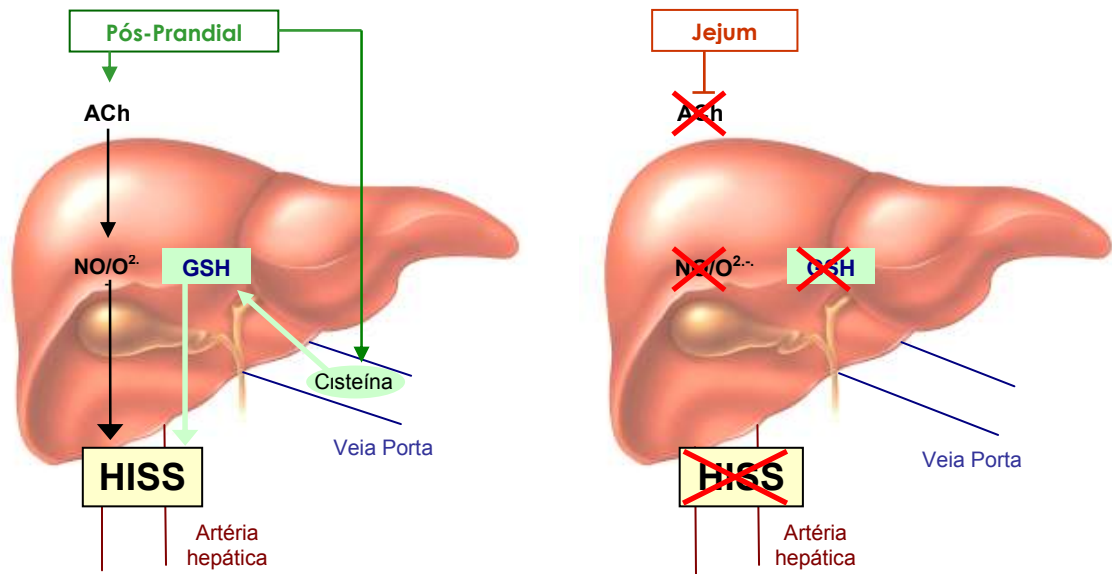
Uma hipótese bastante interessante, embora puramente especulativa, para a etiologia da resistência à insulina pode ser proposta. Segundo esta hipótese, a patogénese da resistência à insulina estaria directamente ligada à inibição da HISS através da diminuição dos níveis hepáticos de GSH. Esta depleção ocorreria devido ao aumento do efluxo sinusoidal do GSH hepático, para neutralizar os radicais livres formados em recidivas de hiperglicémia de etiologia genética e/ou ambiental. O fígado é o reservatório biológico de GSH e tem, ao contrário dos outros órgãos, capacidade para exportar este tripéptido para o plasma em caso de necessidade (Lu, 1998; Ookhtens *et al.*, 1998). A canalização das reservas hepáticas de GSH para o combate antioxidante teria como consequência a diminuição do GSH hepático e inibição da secreção da HISS. A falta de libertação da HISS após as refeições iria, por sua vez, acentuar os episódios de hiperglicémia no estado pós-prandial imediato e agravar a resistência à insulina, iniciando um ciclo que culminaria na diabetes tipo 2, após exaustão da célula  $\beta$ .

Assim, propõe-se a hipótese de que o GSH tem duas funções primordiais no organismo, uma como defesa antioxidante e outra, como regulador da secreção da HISS no fígado. A alteração no equilíbrio entre estas funções, induzida pelo aumento do *stress* oxidativo, desvia o GSH hepático para o seu papel de antioxidante, sacrificando a sensibilização da acção da insulina pela HISS. De acordo com esta hipótese, a alteração na secreção da HISS é o evento inicial na patogénese da resistência à insulina, sendo responsável pela perda do controlo glicémico no estado pós-prandial que é detectável apenas após as refeições (Lautt, 2004). Numa segunda fase, o fígado perde a sua capacidade de tampão *redox* do organismo, diminuindo assim a exportação de GSH para o plasma. Os

radicais livres acumulam-se e começam a afectar a acção da insulina ao nível do receptor através dos mecanismos supra mencionados (Hansen *et al.*, 1999; Tirosh *et al.*, 2000). Nesta fase é afectada a componente da acção da insulina independente da HISS, e a resistência à insulina passa a ser detectável tanto no estado de jejum como no estado pós-prandial, acabando por evoluir para a diabetes tipo 2 quando o pâncreas não mais conseguir produzir hiperinsulinémia compensatória.

### **A importância do fígado na sensibilidade periférica á insulina**

Os estudos apresentados sustentam o conceito de que o fígado desempenha um papel central no controlo da sensibilidade à insulina. Pela primeira vez demonstrou-se que a sensibilidade à insulina pode ser potenciada pela co-administração intraportal de dadores de NO e GSH a animais em jejum, desde que a concentração intrahepática de GSH alcance os níveis observados no estado pós-prandial. Parece assim que o aumento do NO e GSH hepáticos, em conjunto, mimetiza o sinal prandial descrito por Lautt em 2001, e que está representado em esquema na figura 6.6.



**Figura 6.6:** No estado pós-prandial o aumento de nutrientes no sangue portal conduz a um aumento nos níveis de glutathione (GSH) hepático. Simultaneamente, é iniciado um reflexo parassimpático hepático que resulta na libertação de acetilcolina (ACh) levando à produção de monóxido de azoto (NO) e radical anião superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) pelo NOS hepático. O GSH e o NO hepático são ambos fundamentais para a secreção da HISS pelo fígado. Em jejum, a síntese da HISS está bloqueada devido à diminuição do tónus parassimpático hepático, bem como da síntese de NO. Os níveis de GSH estão também diminuídos em jejum devido à baixa disponibilidade de cisteína para a síntese do tripéptido.

Este sinal conduz à libertação da HISS após uma refeição e a uma potenciação da acção da insulina no músculo esquelético. Qualquer alteração na sua transmissão conduz a resistência à insulina, exclusiva do estado pós-prandial, e que não é detectada no estado de jejum.

## 7. EFEITO DOS NITROSOTIOIS, GSNO E SNAP, NA SENSIBILIDADE À INSULINA E SUA RELAÇÃO COM O ESTADO PRANDIAL

### 7.1. INTRODUÇÃO

O mecanismo pelo qual o NO e o GSH, em conjunto, aumentam a sensibilidade à insulina permanece desconhecido. Está descrito que na presença de um oxidante forte, tal como o oxigénio molecular, o NO reage com grupos tiol de resíduos de cisteína para formar S-nitrosotiois. Os RSNOs são moléculas estáveis, devido à ligação covalente que se estabelece entre o átomo de azoto do NO e o átomo de enxofre da cisteína, podendo por isso ser armazenados ou transportados na corrente sanguínea (Hogg, 2002). Apesar da sua estabilidade a ligação S-NO é reversível na presença de agentes redutores, como o GSH ou a hemoglobina reduzida, pelo que os RSNOs têm capacidade de fornecer NO aos tecidos, sendo muitas vezes descritos como uma forma latente de NO (Stamler *et al.*, 1992; Jia *et al.*, 1996). Os RSNOs são biologicamente activos como vasodilatadores, tendo sido proposto que a sua formação é um passo intermediário na activação do GC pelo NOS (Mellion *et al.*, 1983). A S-nitrosoalbumina, S-nitrosohemoglobina, S-nitrosocalmodulina e o S-nitrosoglutationo contam-se entre as muitas espécies nitrosadas existentes nos sistemas fisiológicos (Stamler, 2003; Al-Sa'doni *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005).

A existência de RSNOs foi inicialmente encarada como estratégia evolutiva de armazenamento e transporte do instável NO (Stamler *et al.*, 2001). A sua semi-vida longa deve-se em parte às suas características químicas peculiares uma vez que, para além de não serem inactivados por espécies radicalares (Schrammel *et al.*, 1998; Hallstrom *et al.*, 2002), podem inclusivamente ser um produto da reacção do  $O_2^{\bullet}$  com o NO, tal como sugerido no capítulo 4. Jonathan Stamler resumiu esta particularidade dos RSNOs num editorial da revista "Circulation Research", sugerindo que "a natureza encontrou uma elegante forma de explorar um subproduto metabólico deletério, o  $O_2^{\bullet}$ , utilizando-o

para preservar a actividade biológica do NO sob a forma de reserva nitrosada" (Stamler, 2004).

Hoje em dia sabe-se que os RSNOS são muito mais do que um reservatório de NO. Várias evidências sugerem que estes compostos desempenham um importante papel fisiológico, independente da activação do GC, na modulação da actividade de enzimas (Foster *et al.*, 2003; Triggle *et al.*, 2003; Stamler, 2004). A reacção de S-nitrosação tem sido apontada como uma modificação pós-translaccional envolvida na regulação alostérica da função proteica, em tudo semelhante à clássica fosforilação (Stamler *et al.*, 2001; Mannick *et al.*, 2002). O mecanismo de acção proposto para a modulação da função proteica pelos RSNOS é a transnitrosação, que consiste basicamente na transferência do grupo NO de um RSNO circulante para um resíduo de cisteína de uma proteína ou de um péptido. Tal como a fosforilação, a S-nitrosação altera a actividade biológica de proteínas de uma forma reversível controlada por ciclos de nitrosação/desnitrosação (Lipton *et al.*, 1993; Eu *et al.*, 2000). Foi recentemente proposto que esta modificação pós-translaccional está envolvida na vasodilatação induzida pela hipóxia (Lipton *et al.*, 2001; Lipton, 2001), na inibição da apoptose (Stamler *et al.*, 1992), e no controlo da adesão plaquetária (Mellion *et al.*, 1981; Radomski *et al.*, 1987), entre outros efeitos.

A capacidade de nitrosar proteínas é específica dos RSNOS, o que justifica que muitos dos seus efeitos biológicos sejam distintos dos do NO isolado (Feelisch, 1993; Lipton *et al.*, 1993; Hogg, 2002). Devido às suas características particulares, os RSNOS representam uma nova classe de agentes terapêuticos, clinicamente testados (Leopold *et al.*, 1997; Leopold *et al.*, 2000) e com aplicação demonstrada em patologias do foro circulatório e respiratório. Foi recentemente sugerido que estes fármacos podem ainda ter um papel relevante na doença de Parkinson (Chung *et al.*, 2004), em processos inflamatórios (Liu *et al.*, 2004), na secreção da insulina, nomeadamente, regulando o enzima glucocinase da célula  $\beta$  (Rizzo *et al.*, 2003) e modulando a ligação da insulina ao seu receptor na membrana celular de leucócitos (Ragoobirsingh *et al.*, 2004).



Partindo da observação de que a via de síntese da HISS necessita de GSH e NO que, por sua vez, podem reagir para formar um S-nitrosotiol, propôs-se a hipótese de que a acção da HISS é mediada pela formação de S-nitrosoglutationo.

Neste capítulo testou-se a hipótese de que a administração de RSNOs, o S-nitrosoglutationo e o S-nitrosoacetilpenicilamina, promove um aumento na sensibilidade à insulina tanto no estado de jejum como no estado pós-prandial, mimetizando a acção hipoglicemiante da HISS.

## **7.2. PROTOCOLOS**

Os animais foram sujeitos a um jejum de 24 h, de forma a inibir totalmente a acção da HISS. Nos protocolos desenhados para testar o efeito dos fármacos no estado pós-prandial, o jejum foi seguido de uma hora com livre acesso à comida.

Além do procedimento cirúrgico descrito no capítulo 3.3, cateterizou-se a veia porta. A sensibilidade à insulina foi avaliada utilizando o RIST, descrito previamente no capítulo 3.5.

## **7.3. RESULTADOS**

### **7.3.1. Efeito do GSNO, SNAP e SIN-1 na sensibilidade à insulina, no estado de jejum**

Todos os protocolos descritos foram realizados em animais sujeitos a um período de jejum de 24 h, de forma a inibir totalmente a acção da insulina dependente da HISS.

### 7.3.1.1. Administração de GSNO no estado de jejum

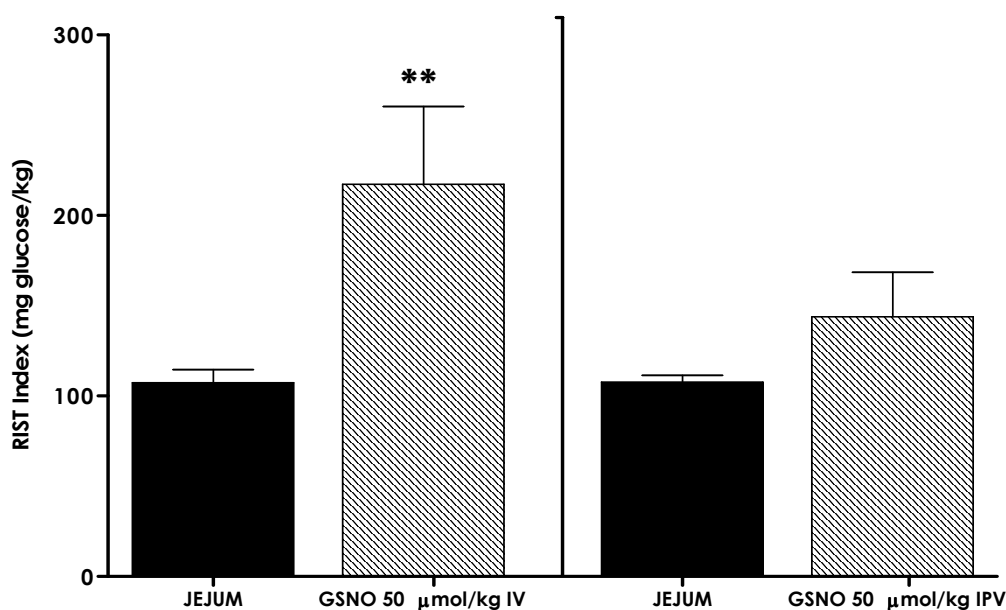
Realizou-se um RIST no estado de jejum. Posteriormente administrou-se o S-nitrosotiol, GSNO, numa dose de 50  $\mu\text{mol/kg}$  por via intravenosa ou por via intraportal. Esta dose foi escolhida por ser equimolar à dose de SIN-1 que promoveu um aumento da sensibilidade à insulina quando co-administrada com GSH-E 1mmol/kg por via intraportal, ou seja, 10mg/kg (ver resultados 6.3.3.2.).

A perfusão de GSNO foi feita sob a forma de bólus de 0.4 ml ao longo de 10 min. Após um período de estabilização de 60 min efectuou-se um segundo RIST para avaliar o efeito do GSNO na sensibilidade à insulina.

Observou-se uma descida significativa na PAM de  $122.1 \pm 4.2$  mmHg para  $47.5 \pm 2.3$  mmHg ( $p < 0.001$ ,  $n=8$ ) imediatamente após a administração intravenosa do GSNO. Este decréscimo nas pressões foi transitório e reverteu para valores controlo ao fim de 20 minutos ( $126.4 \pm 3.4$  mmHg). A glicémia variou de  $87.0 \pm 4.12$  mg/dl, antes de iniciar o RIST em jejum, para  $104.0 \pm 5.8$  mg/dl ( $p < 0.01$ ,  $n=8$ ) após a administração intravenosa de GSNO.

A administração de GSNO 50  $\mu\text{mol/kg}$  por via intraportal provocou uma descida significativa na PAM de  $125.2 \pm 4.1$  mmHg para  $57.5 \pm 6.0$  mmHg ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ , que também reverteu para valores controlo num curto espaço de tempo ( $120.8 \pm 4.6$  mmHg). A glicémia variou de  $90.1 \pm 4.1$  mg/dl para  $111.6 \pm 7.2$  mg/dl após administração intraportal de GSNO ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ).

Os resultados das experiências desenhadas para avaliar o efeito da administração intravenosa e intraportal do GSNO na sensibilidade à insulina encontram-se representados graficamente na figura 7.1.



**Figura 7.1:** Efeito do nitrosotiol GSNO 50 µmol/kg na sensibilidade à insulina em animais sujeitos a 24 horas de jejum. Este nitrosotiol administrado por via sistêmica (iv) reverteu a resistência à insulina causada pelo estado de jejum (n=8). A administração deste nitrosotiol por via intraportal (ipv) não alterou a sensibilidade à insulina, n=6; \*\*=p <0.01. Teste Wilcoxon.

Na primeira série de experiências o RIST Index em jejum foi de 107.3±7.2 mg glucose/kg, tendo aumentado para 217.3±43.1 mg glucose/kg (n=8, p <0.01) após a administração intravenosa de GSNO 50 µmol/kg, o que corresponde a um aumento de 102.9±7.7 % na sensibilidade à insulina.

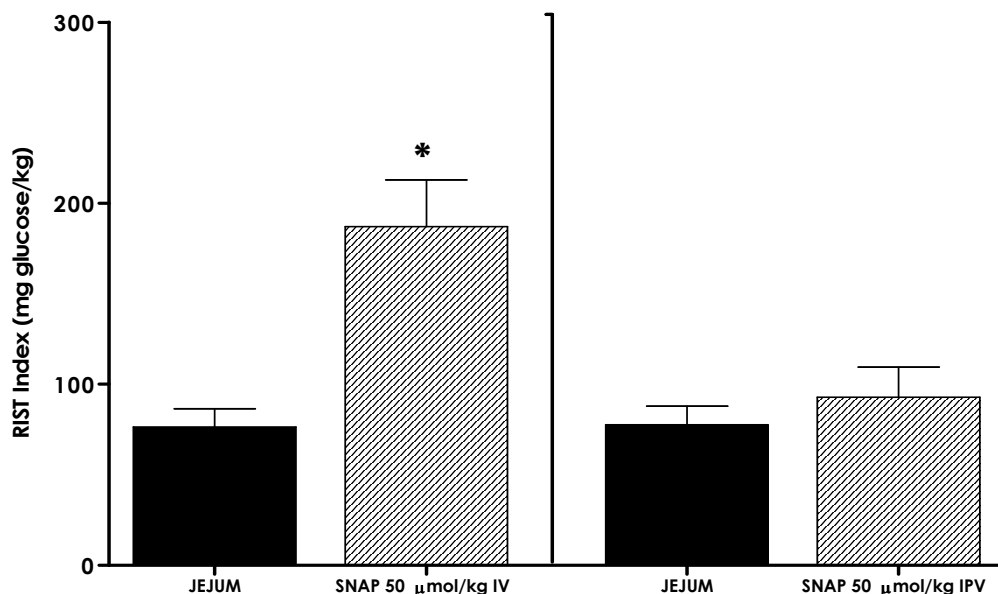
Num segundo grupo de animais o RIST Index foi de 107.7± 3.8 mg glucose/kg. Após a administração intraportal de GSNO 50 µmol/kg o RIST foi de 143.9±24.7 mg glucose /kg (n= 6).

### 7.3.1.2. Administração de SNAP no estado de jejum

Realizou-se um RIST no estado de jejum. Posteriormente administrou-se um outro S-nitrosotiol, o SNAP, numa dose equimolar à dose de GSNO previamente utilizada ( $50 \mu\text{mol/kg}$ ), por via intravenosa ou por via intraportal, sob a forma de bólus de 0.4 ml ao longo de 10 min. Após um período de estabilização de 60 min efectuou-se um segundo RIST para avaliar o efeito do SNAP na sensibilidade à insulina.

Antes da administração de SNAP intravenoso a PAM era de  $119.5 \pm 6.5 \text{ mmHg}$ , tendo decrescido para  $58.3 \pm 2.2 \text{ mmHg}$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ ) após a administração do fármaco. Ao fim de 20 minutos estabilizou em valores basais de  $118.5 \pm 4.7 \text{ mmHg}$ . O SNAP aumentou a glicémia de  $84.2 \pm 4.6 \text{ mg/dl}$  para  $101.5 \pm 6.7 \text{ mg/dl}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). A administração intraportal de SNAP alterou a PAM de  $117.0 \pm 7.1 \text{ mmHg}$  para  $55.3 \pm 3.4 \text{ mmHg}$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 6$ ). Esta descida acentuada foi, contudo, revertida ao fim de 20 minutos para  $119.0 \pm 10.1 \text{ mmHg}$ . A glicémia alterou de  $91.5 \pm 3.6 \text{ mg/dl}$  para  $112.2 \pm 7.9 \text{ mg/dl}$  ( $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) após a administração intraportal de SNAP.

O gráfico da figura 7.2 representa o efeito da administração intravenosa e intraportal de SNAP na sensibilidade à insulina.



**Figura 7.2:** A administração do nitrosotiol SNAP 50 µmol/kg por via intravenosa (iv) aumentou a sensibilidade à insulina, em  $56.8 \pm 5.84\%$ ,  $n=6$ ,  $*=p < 0.05$ . A administração deste nitrosotiol por via intraportal (ipv) não alterou a sensibilidade à insulina,  $n=6$ . Teste de Wilcoxon.

No protocolo em que o SNAP foi administrado por via sistêmica, o RIST Index no estado de jejum foi de  $76.4 \pm 10.2$  mg glucose/kg. O SNAP 50 µmol/kg provocou um aumento significativo na sensibilidade à insulina para  $187.0 \pm 25.9$  mg glucose/kg ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ), o que corresponde a um aumento de  $152.6 \pm 5.8\%$  na sensibilidade à insulina.

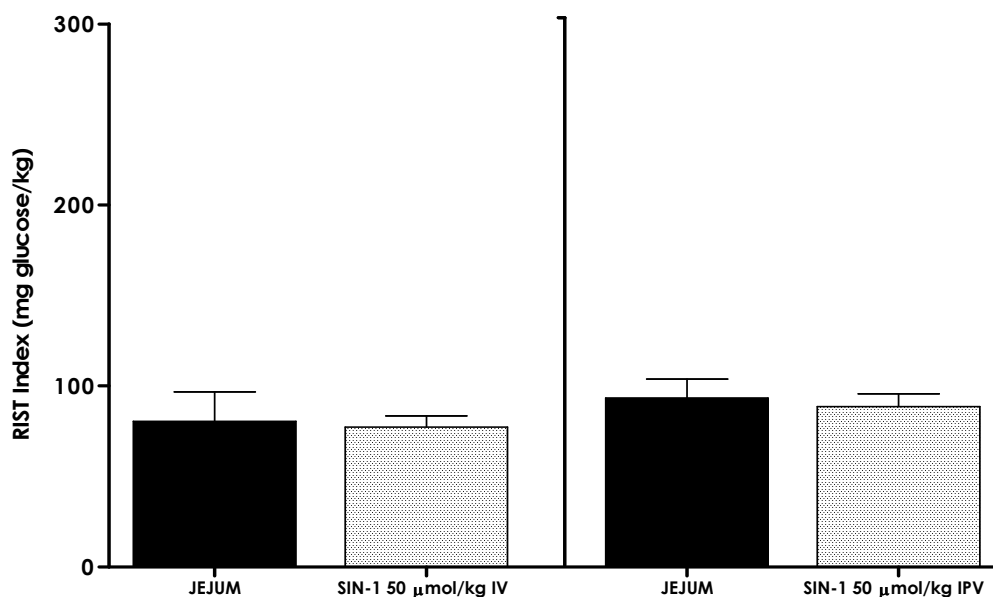
No segundo protocolo, em que o SNAP foi administrado por via intraportal, o RIST Index foi de  $77.6 \pm 10.3$  mg glucose/kg em situação controlo e não sofreu alterações após administração de SNAP 50 µmol/kg ( $92.8 \pm 16.7$  mg glucose/kg,  $n=6$ ).

### 7.3.1.3. Administração de SIN-1 no estado de jejum

Realizou-se um RIST no estado de jejum. Posteriormente administrou-se o dador de monóxido de azoto não-nitrosotiol, SIN-1, numa dose equimolar à dose de nitrosotióis testada nos protocolos anteriores: 50  $\mu\text{mol/kg}$ , o que corresponde a 10mg/kg de fármaco. A perfusão do fármaco foi feita por via intravenosa ou por via intraportal, sob a forma de bólus de 0.4 ml ao longo de 10 min. Após um período de estabilização de 60 min efectuou-se um segundo RIST para avaliar o efeito do SIN-1 na sensibilidade à insulina.

Tanto a administração sistémica como intraportal deste fármaco provocaram uma descida acentuada na PAM (SIN-1 iv: de  $116.0 \pm 7.7$  mmHg para  $60.0 \pm 4.0$  mmHg,  $p < 0.001$ ,  $n=5$ ; SIN-1 ipv: de  $116.4 \pm 3.6$  mmHg para  $53.4 \pm 6.8$  mmHg,  $p < 0.001$ ,  $n=5$ ). Ao fim de 50 minutos a PAM ainda se encontrava baixa:  $77.2 \pm 9.6$  mmHg, pelo que este fármaco tem um efeito hemodinâmico mais prolongado que os outros testados, GSNO e SNAP, traduzido num maior tempo de recuperação das pressões arteriais.

O SIN-1 provocou um aumento estatisticamente significativo da glicémia, independentemente do modo de administração (SIN-1 iv: de  $91.4 \pm 1.3$  mg/dl para  $113.2 \pm 6.1$  mg/dl,  $p < 0.05$ ,  $n=5$ ; SIN-1 ipv: de  $97.6 \pm 5.4$  mg/dl para  $115.5 \pm 9.22$  mg/dl,  $p < 0.05$ ,  $n=5$ ). O gráfico da figura 7.3 representa o efeito da administração intravenosa e intraportal do SIN-1 na acção da insulina.



**Figura 7.3:** O dador de monóxido de azoto não-nitrosotiol, SIN-1, não alterou a sensibilidade à insulina quando administrado quer por via sistémica (iv) (n=5) quer por via intraportal (ipv) (n=5). Teste Wilcoxon.

No primeiro protocolo, o RIST Index controlo foi de  $80.4 \pm 16.3$  mg glucose/kg. Após a administração de SIN-1 50 µmol/kg por via sistémica, o RIST Index foi de  $77.3 \pm 13.9$  mg glucose/kg, o que não é significativamente diferente (n = 5).

Num segundo grupo de animais, o RIST Index controlo foi de  $93.5 \pm 10.4$  mg glucose/kg. Quando se administrou o SIN-1 50 µmol/kg por via intraportal não houve alteração significativa da sensibilidade à insulina:  $88.7 \pm 6.9$  mg glucose/kg (n = 5).

### **7.3.2. Efeito do GSNO e SNAP na sensibilidade à insulina, no estado pós-prandial**

Todos os protocolos descritos foram realizados em animais sujeitos a um período de jejum de 24 h seguido de livre acesso à comida durante 1 h, de forma a maximizar a acção da insulina dependente da HISS.

A administração do GSNO e do SNAP foi feita exclusivamente por via intravenosa, visto não se ter observado um aumento significativo da sensibilidade à insulina após administração destes fármacos por via intraportal, nos animais em jejum (ver resultados 7.3.1.1 e 7.3.1.2.)

Não se testou o efeito do SIN-1 na sensibilidade à insulina no estado pós-prandial uma vez que, contrariamente ao observado com os S-nitrosotióis, o SIN-1 não reverteu a inibição da HISS induzida pelo estado de jejum (ver resultados 7.3.1.3.).

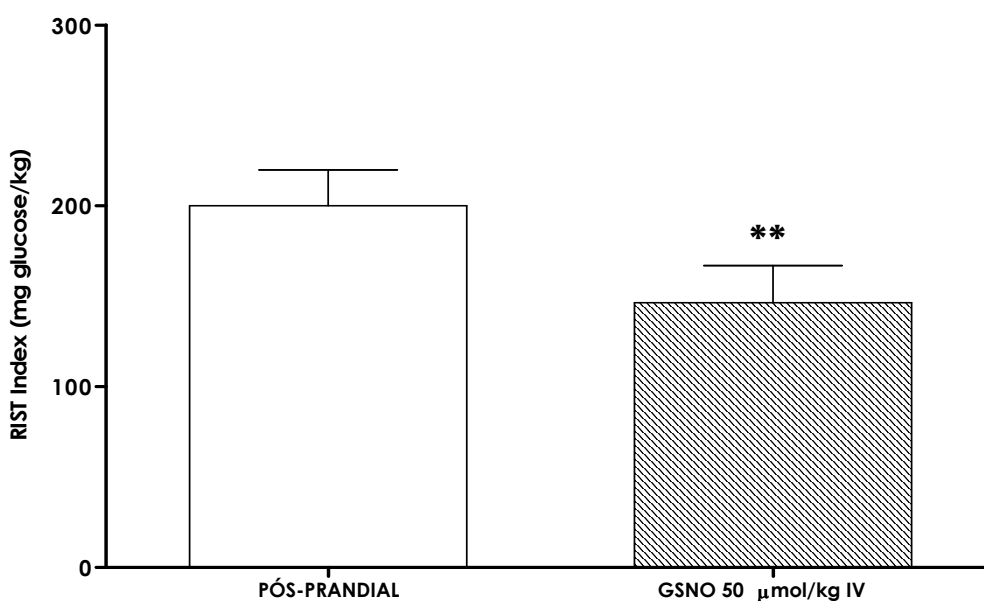
#### **7.3.2.1. Administração de GSNO no estado pós-prandial**

Realizou-se um RIST no estado pós-prandial. Posteriormente administrou-se o S-nitrosotiol, GSNO, numa dose de 50  $\mu$ mol/kg, por via intravenosa. Tal como no protocolo efectuado no estado de jejum, o fármaco foi administrado sob a forma de bólus de 0.4 ml ao longo de 10 min. Após um período de estabilização de 60 min efectuou-se um segundo RIST para avaliar o efeito do GSNO na sensibilidade à insulina no estado pós-prandial.

Tal como observado anteriormente na administração deste fármaco a animais em jejum, a PAM diminuiu de  $120.6 \pm 4.6$  mmHg para  $52.8 \pm 1.5$  mmHg ( $p < 0.001$ ,  $n=6$ ). Estes valores recuperaram para valores controlo ao fim de cerca de 20 min. Os níveis de glucose não sofreram alteração significativa com a administração intravenosa de GSNO: de  $112.5 \pm 3.6$  mg/dl para  $112.4 \pm 3.7$  mg/dl.



No primeiro grupo de animais o RIST Index foi de  $204.4 \pm 18.6$  mg glucose/kg. A administração de GSNO  $50 \mu\text{mol/kg}$  por via intravenosa provocou uma inibição de  $29.2 \pm 5.0$  % da sensibilidade à insulina, obtendo-se um RIST Index de  $138.2 \pm 20.4$  mg glucose/kg ( $p < 0.01$ ,  $n=11$ ). Os resultados das experiências em que se avaliou o efeito da administração intravenosa de GSNO na sensibilidade à insulina encontram-se esquematizados na figura 7.4.



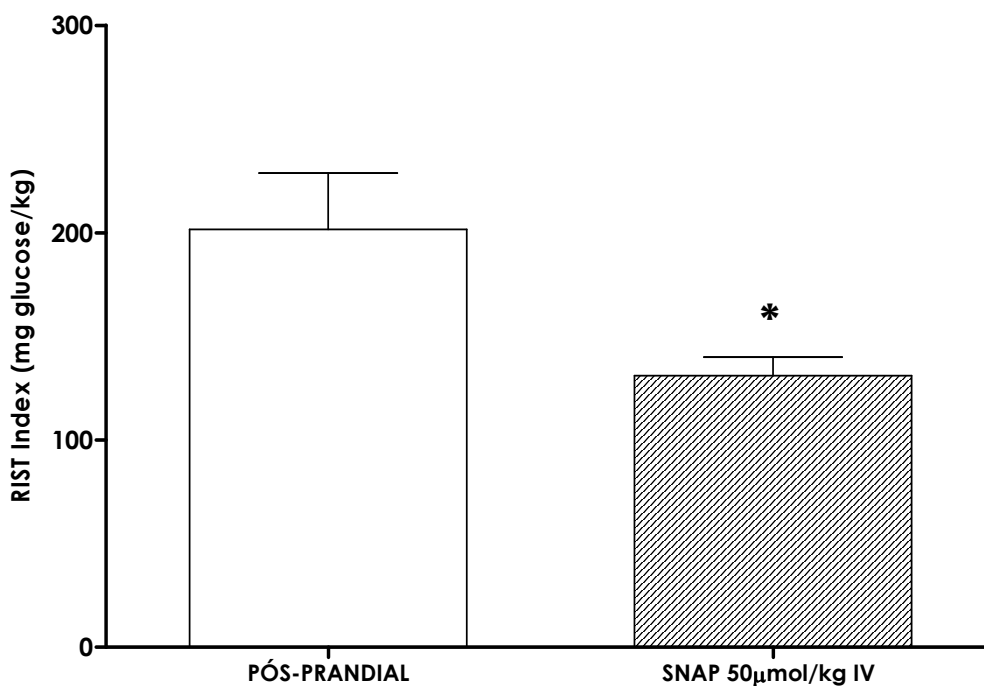
**Figura 7.4:** Efeito do GSNO  $50 \mu\text{mol/kg}$  na sensibilidade à insulina no estado pós-prandial. A administração intravenosa (iv) deste nitrosotiol diminui a sensibilidade à insulina  $n=6$ . \*\*= $p < 0.01$ . Teste Wilcoxon.

### 7.3.2.2. Administração de SNAP no estado pós-prandial

Após a realização de um RIST controlo no estado pós-prandial, administrou-se o S-nitrosotiol, SNAP, numa dose de  $50 \mu\text{mol/kg}$  por via intravenosa. A perfusão deste fármaco foi feita sob a forma de bólus de  $0.4$  ml ao longo de  $10$  min. Após um período de

estabilização de 60 min efectuou-se um segundo RIST para avaliar o efeito do SNAP na sensibilidade à insulina no estado pós-prandial.

A administração deste fármaco provocou uma descida na PAM de  $125.0 \pm 1.2$  mmHg para  $56.25 \pm 2.7$  mmHg ( $p < 0.01$ ,  $n=4$ ), que foi revertida após 20 minutos. A glicémia variou de  $103.8 \pm 6.3$  mg/dl para  $121.3 \pm 9.5$  mg/dl após a administração intravenosa de SNAP. Após a administração intravenosa de SNAP  $50 \mu\text{mol/kg}$ , o RIST Index diminuiu  $30.3 \pm 13.4$  %: de  $201.6 \pm 27.3$  mg glucose/kg para  $131.1 \pm 8.9$  mg glucose/kg ( $p < 0.05$ ,  $n=4$ ). Estes resultados estão representados graficamente na figura 7.5.



**Figura 7.5:** Efeito do SNAP  $50 \mu\text{mol/kg}$  na sensibilidade à insulina no estado pós-prandial. A administração intravenosa (iv) deste nitrosotiol diminui a sensibilidade à insulina,  $n=4$ .  $*=p < 0.05$ . Teste de Wilcoxon.

A título de resumo apresenta-se em seguida a tabela V, que esquematiza as alterações percentuais observadas na sensibilidade à insulina após administração GSNO, SNAP e SIN-1 em função da via de administração e do estado prandial.

**Tabela V:** Efeito da administração de dadores de NO, quimicamente distintos, na sensibilidade à insulina em função do modo de administração e do estado prandial. ns- sem diferença estatística; ↑- aumento; ↓- decréscimo.

	JEJUM		PÓS-PRANDIAL
	<u>IPV</u>	<u>IV</u>	<u>IV</u>
<b>GSNO</b>	ns	↑ <b>102.9 %</b>	↓ <b>29.2 %</b>
<b>SNAP</b>	ns	↑ <b>152.6 %</b>	↓ <b>30.3 %</b>
<b>SIN-1</b>	ns	ns	-

#### 7.4. DISCUSSÃO

Foi testada a hipótese de que a administração de S-nitrosotióis mimetiza a acção hipoglicemiante da HISS.

Observou-se um aumento da sensibilidade à insulina após administração intravenosa, mas não após administração intraportal, de GSNO e SNAP a animais no estado de jejum. O nitrovasodilatador clássico, SIN-1, administrado nas mesmas condições, não mimetizou a acção da HISS.

Concluiu-se que o órgão alvo dos RSNOs na modulação da sensibilidade à insulina não é o fígado, mas sim um órgão periférico. Propõe-se como hipótese que os RSNOs mimetizam a acção da HISS no seu local de acção, o músculo esquelético, mas são ineficazes na estimulação da sua secreção hepática.

Constatou-se ainda que no estado pós-prandial, em que a síntese da HISS é máxima, a administração intravenosa de RSNOs induziu uma inesperada insulinoresistência. Estes resultados sugerem que a administração de RSNOs em situações em que a HISS está a ser produzida desencadeia a sua inibição por um mecanismo de retroacção negativa.

### **O papel dos nitrosotíóis na sensibilidade à insulina**

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o efeito da administração de RSNOs na sensibilidade à insulina foi condicionado pelo modo de administração dos fármacos. Constatou-se assim que, em ratos em jejum, a administração intravenosa de RSNOs induziu um aumento significativo da sensibilidade à insulina, ao contrário da administração intraportal. Estes resultados sugerem que os RSNOs reverteram a resistência à insulina induzida pelo estado de jejum, mimetizando a acção da HISS no seu local de acção – o músculo esquelético, e não no seu local de síntese – o fígado. Mais ainda, os resultados apontam para que a administração intraportal de GSNO e SNAP tenha conduzido à sua rápida metabolização por parte do fígado, o que impediu a sua recirculação e o seu efeito sensibilizador da insulina nos tecidos periféricos. De facto, apesar de não se ter observado uma diferença estatisticamente significativa na sensibilidade à insulina após administração intraportal de RSNOs, o RIST Index mostrou uma ligeira tendência para aumentar. Esta tendência sugere que os fármacos teriam um efeito semelhante ao observado após administração sistémica, não fosse a sua rápida metabolização pelos hepatócitos, que preveniu a sua recirculação e impediu a sua acção mimetizadora da HISS no músculo esquelético. Corroborando esta hipótese, Kashiba *et al.* demonstraram em 1999 que os RSNOs apresentam grande instabilidade em homogenatos de fígado, onde são rapidamente degradados devido ao elevado poder redutor do fígado, por comparação com o plasma, onde permanecem estáveis. Embora o modo de administração dos RSNOs tenha condicionado o seu efeito na sensibilidade á

insulina, não influenciou a acção dos fármacos quer a nível dos valores da glicémia, quer a nível das alterações hemodinâmicas. Este facto pode ser explicado pela observação de que a dose de GSNO necessária para induzir um decréscimo de cerca de 30% na pressão arterial média em ratos é de 1  $\mu$ mol/kg (Sehba *et al.*, 1999), dose esta que é cerca de 50 x inferior à utilizada nesta série de experiências. Assim, apesar de os RSNOs sofrerem um efeito de primeira passagem, quando administrados por via intraportal, a dose de 50  $\mu$ mol/kg utilizada permitiu a recirculação de fármaco numa concentração suficiente para provocar alterações significativas na PAM.

Uma outra conclusão interessante desta série de experiências é que o efeito dos RSNOs na sensibilidade à insulina foi significativamente diferente do efeito induzido por um dador de NO não-nitrosotiol. Enquanto que a administração intravenosa de GSNO e de SNAP reverteu parcialmente a resistência à insulina induzida pelo jejum, o SIN-1 não provocou qualquer alteração no RIST Index, tanto após administração intraportal como intravenosa. Apesar de o SIN-1, o GSNO e o SNAP terem exercido um efeito vasodilatador e hiperglicémico de magnitude semelhante, só os RSNOs induziram um aumento da sensibilidade à insulina, o que demonstra que a hiperglicémia e a vasodilatação temporárias observadas não foram responsáveis pelo aumento da captação de glucose induzida por estes fármacos. Está descrito que os RSNOs podem, ao contrário de outros dadores de NO, alterar a função de proteínas por transnitrosação. Apesar de meramente especulativa, propõe-se a hipótese de que estes fármacos mimetizaram a acção da HISS através da transnitrosação de proteínas no músculo esquelético ao contrário do SIN-1, que devido à sua natureza não-nitrosotiol, não induziu reacções de transnitrosação.

Uma das proteínas candidatas a S-nitrosação pelos RSNOs é o enzima glucocinase (GK), cuja actividade regula a glicólise e a captação de glucose no fígado e pâncreas, encontrando-se diminuída em doentes diabéticos (Basu *et al.*, 2001). Foi recentemente demonstrado que o GK é activado por nitrosação no pâncreas (Rizzo *et al.*, 2003), o que sugere que o efeito sensibilizador da insulina induzido pelos RSNOs pode ser devido a

regulação pós-transcricional da isoforma do enzima hexocinase presente no músculo. Conclui-se que o GSNO e o SNAP têm um papel na modulação da sensibilidade à insulina, que está intimamente relacionado com a natureza da ligação S-NO.

Os resultados obtidos após a administração sistémica de GSNO e SNAP no estado pós-prandial mostraram uma diminuição do RIST Index de cerca de 30 %, em dissonância com os dados obtidos para animais em jejum em que a administração sistémica de RSNOs aumentou a sensibilidade à insulina. Estes resultados sugerem que a administração de RSNOs no estado pós-prandial, em que a síntese da HISS é máxima, induz uma inibição da sua acção, sugerindo um efeito regulador da acção hipoglicemiante da HISS pelos RSNOs.

A hipótese proposta é a seguinte: o facto de os RSNOs aumentarem a sensibilidade à insulina por actuação directa no músculo esquelético indica que a natureza química da HISS está relacionada com a ligação S-NO. Pressupondo que a HISS é um nitrosotiol ou uma proteína nitrosada, parece fisiologicamente adequado que no estado pós-prandial, em que a sua secreção é máxima, a administração de um mimetizador da sua acção desencadeie um mecanismo de retroacção negativa, provocado por um aumento de RSNOs em circulação, em analogia com outros sistemas de natureza humoral.

Esta retroacção negativa pode ocorrer de várias formas, nomeadamente através da desensibilização directa dos receptores de insulina ou dos GLUT-4 ou ainda através da diminuição da acção da HISS no músculo esquelético.

Em relação ao primeiro mecanismo proposto, a hipótese é que a administração de RSNOs no estado pós-prandial desencadeia um mecanismo compensatório da excessiva estimulação da via da HISS, promovendo a desensibilização dos receptores de insulina ou uma diminuição da expressão dos transportadores de glucose, GLUT-4. Esta hipótese é suportada pelos resultados de Yasukawa *et al.* em que a incubação de mioblastos de rato em cultura com elevadas doses de GSNO inibiu a actividade de tirosina cinase do receptor de insulina (Yasukawa *et al.*, 2005). Foi ainda demonstrado que a administração

crónica de GSNO em concentrações elevadas (100 mM) inactivou a Akt e o IRS-1, proteínas chave na cascata de transdução de sinal da insulina, através de uma reacção de S-nitrosação (Carvalho-Filho *et al.*, 2005).

McGrowder *et al.* confirmaram que a administração de GSNO induziu resistência à insulina no estado pós-prandial (McGrowder *et al.*, 1999; McGrowder *et al.*, 2001) tendo proposto mais tarde que o mecanismo estaria relacionado com alterações no número e afinidade de receptores de insulina, embora tenham realizado os seus estudos em leucócitos, que não são células alvo da insulina por excelência (McGrowder *et al.*, 2002; Ragoobirsingh *et al.*, 2004). Por outro lado, o mesmo grupo publicou recentemente um estudo realizado em culturas primárias de músculo esquelético em que concentrações na ordem dos micromolar de GSNO aumentaram a captação de glucose nas preparações em estudo, enquanto que concentrações elevadas (da ordem dos milimolar) conduziram a um efeito inibitório na captação de glucose, tanto em animais normais como em diabéticos (McGrowder *et al.*, 2006a; McGrowder *et al.*, 2006b). Estes resultados parecem sugerir que o efeito sensibilizador da acção da insulina exercido pelos RSNOs é dependente da concentração no meio destes compostos. Já em 1997, Balon *et al.* tinham descrito que a exposição de células do músculo esquelético a concentrações baixas de doadores de NO aumentava a captação de glucose, enquanto que com doses elevadas do fármaco o transporte de glucose diminuía (Balon *et al.*, 1997). O grupo de McGrowder verificou ainda que concentrações baixas de GSNO potenciaram não só a captação basal de glucose, como também a captação de glucose estimulada pela insulina aumentando o transporte de glucose mediado pela insulina em cerca de 40 % (McGrowder *et al.*, 2006b). O aumento da captação de glucose induzido por concentrações baixas de RSNOs foi observado tanto em ratos normais como em diabéticos, o que sugere que o aporte de glucose induzido pelos RSNOs se encontra funcional no músculo esquelético de animais diabéticos (McGrowder *et al.*, 2006b).

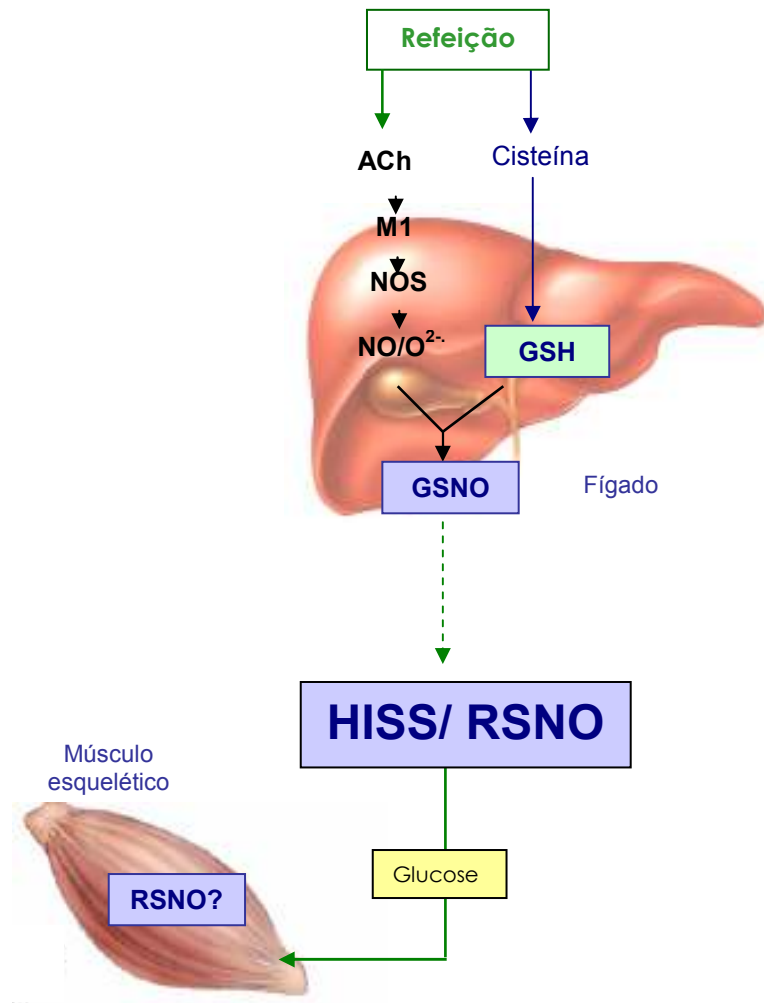
A diminuição na acção da insulina observada após a administração sistémica de RSNOs a animais no estado pós-prandial também se poderá dever a um bloqueio da acção da HISS no músculo esquelético.

Uma hipótese a considerar diz respeito à diminuição da acção da HISS por factores autócrinos. A administração de RSNOs pode potenciar a síntese de um metabolito produzido no músculo que inibe a acção da HISS neste órgão, através de um mecanismo autócrino. O lactato é um potencial candidato a esta função, uma vez que os RSNOs podem mimetizar um sinal de hipóxia, originando lactato (Lipton *et al.*, 2001). Embora seja normalmente encarado como um subproduto metabólico que serve de substrato para a neoglucogénese, o lactato tem um papel relevante na modulação da sensibilidade à insulina. As evidências são claras: os níveis basais de lactato estão aumentados em doentes com intolerância à glucose (Consoli *et al.*, 1990); a hiperlactatémia reduz a captação de glucose pelo músculo esquelético (Lombardi *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2002) e o mRNA dos transportadores de glucose GLUT-4 (Lombardi *et al.*, 1999), a infusão de lactato na artéria pancreática induz um aumento da secreção da insulina (Federspil *et al.*, 1980) coerente com a hiperinsulinémia observada em situações de resistência à insulina. Constatou-se também que em humanos saudáveis, no estado pós-prandial, a variação temporal dos níveis de lactato ao longo do RIST correlaciona-se inversamente com a acção fisiológica da HISS, sugerindo que este metabolito inibe a sua acção e/ou a sua síntese (Patarrão *et al.*, observações não publicadas).

Os resultados obtidos neste capítulo corroboram a hipótese de a HISS ser um nitrosotiol. A principal evidência surge do facto de a administração de RSNOs reverter a inibição da HISS pelo estado de jejum actuando, não no fígado (o seu local de síntese), mas no músculo esquelético (órgão alvo). Mais ainda, o facto de se observar uma diminuição no RIST Index após administração de RSNOs a animais no estado pós-prandial consolida a acção da HISS como um mecanismo de natureza humoral, finamente regulado por uma clássica inibição por retroacção negativa.



Com base nos resultados apresentados, propõe-se o esquema da figura 7.6 para o mecanismo de acção da HISS: no estado pós-prandial é desencadeado um reflexo parassimpático hepático que conduz à activação do NOS nos hepatócitos. Concomitantemente, aumentam os níveis de GSH no fígado devido a uma maior biodisponibilidade de cisteína. Estas condições favorecem a formação de um composto nitrosado, a HISS, que é lançado na corrente sanguínea para aumentar a captação periférica de glucose no músculo esquelético numa reacção mediada pelo grupo S-NO.



**Figura 7.6:** No estado pós-prandial é desencadeado um reflexo parassimpático hepático que conduz à activação do NOS nos hepatócitos. Concomitantemente, aumentam os níveis de GSH no fígado devido a uma maior biodisponibilidade de cisteína. Estas condições favorecem a formação de um composto nitrosado (RSNO), a HISS, que é lançado na corrente sanguínea para aumentar a captação periférica de glucose no músculo esquelético numa reacção mediada pelo grupo S-NO.

## **8. DISCUSSÃO GERAL**

O objectivo geral desta dissertação consistiu na caracterização da via de sinalização hepática que conduz à libertação da HISS pelo fígado, e que regula a sensibilidade periférica à insulina.

O trabalho aqui apresentado corrobora a hipótese de que a sequência de eventos moleculares que regulam a secreção hepática da HISS se inicia com um reflexo parassimpático que conduz à libertação de ACh, levando posteriormente à produção de NO pelos hepatócitos.

Observou-se que a integridade das vias de síntese de NO e GSH hepáticos é crucial na acção da insulina dependente da HISS, e ainda que a resistência à insulina dependente da HISS pode ser revertida através da administração conjunta de dadores de NO com dadores de GSH.

Constatou-se que a administração sistémica de nitrosotíóis restabelece a acção da HISS em animais no estado de jejum, enquanto que a administração intraportal destas substâncias provoca uma diminuição da sua acção. Os resultados obtidos sugerem que a HISS é um nitrosotiol.

### **8.1. CONSIDERAÇÕES METODOLÓGICAS**

Do ponto de vista metodológico, não se dispõe correntemente de nenhum método que quantifique directamente a HISS, no entanto as suas características farmacodinâmicas têm sido extensivamente estudadas recorrendo a métodos de avaliação da sensibilidade à insulina.

Neste trabalho, a sensibilidade à insulina e a acção da HISS foram quantificadas utilizando o RIST, embora existam outros métodos que se mostraram eficazes na sua detecção, tais como a medição dos gradientes arterio-venosos de glucose nos leitões

vasculares (Xie *et al.*, 1996b; Moore *et al.*, 2002) ou o teste de tolerância à insulina (Xie *et al.*, 1993; Reid *et al.*, 2002).

A escolha do método a utilizar recaiu sobre o RIST devido às diversas vantagens que este apresenta em relação a outras formas de avaliação da sensibilidade à insulina. Por exemplo, ao contrário do ITT, o RIST é um teste euglicémico que permite a manutenção dos níveis basais de glucose, insulina, glucagina e catecolaminas, eliminando assim possíveis artefactos associados a alterações na secreção das hormonas contra-reguladoras. O RIST permite ainda o uso de desenho experimental emparelhado possibilitando a avaliação do efeito de múltiplas manipulações farmacológicas ou cirúrgicas na sensibilidade à insulina, no mesmo animal e no mesmo dia, contrariamente ao ITT que não permite a realização múltipla de testes no mesmo animal devido à hipoglicémia decorrente (Reid *et al.*, 2002). No entanto, e apesar de todas as diferenças conceptuais inerentes, o RIST e o ITT mostraram possuir excelente correlação entre si no que diz respeito à detecção e quantificação da componente da acção da insulina dependente da HISS (Reid *et al.*, 2002).

Já em relação ao *gold standard*, *clamp* hiperinsulinémico euglicémico, estudos comparativos entre as diversas metodologias demonstraram que o HIEC apenas detecta a HISS nos primeiros minutos de infusão de insulina, conduzindo posteriormente a um bloqueio parcial da sua acção (Reid *et al.*, 2002). Foi proposto que o HIEC inibe a acção da HISS devido à prolongada perfusão de insulina que, neste teste, chega a demorar 3 horas. A insulina é normalmente secretada pela célula  $\beta$  do pâncreas de forma pulsátil com uma frequência que varia entre 5 a 30 min em espécies tão distintas como ratos, gatos, babuínos, macacos e humanos (Goodner *et al.*, 1977; Lang *et al.*, 1979; Chou *et al.*, 1991; Rorsman *et al.*, 2003), sendo que alterações no padrão pulsátil da secreção da insulina conduzem a intolerância à glucose (Lang *et al.*, 1981; Zarkovic *et al.*, 1999). Assim o HIEC pode introduzir artefactos na medição da sensibilidade à insulina, decorrentes da perfusão contínua de insulina por períodos de tempo prolongados (Lautt, 2003). Está

também descrito que este método não foi capaz de reproduzir as alterações na sensibilidade à insulina que se observam do estado de jejum para o estado pós-prandial com o RIST e o ITT (Reid *et al.*, 2002).

O HIEC não representa uma alternativa viável para o estudo da HISS uma vez que tem pouca sensibilidade para detectar a componente da acção da insulina dependente da HISS, (Reid *et al.*, 2002). Ao contrário do RIST ou do ITT, em que a insulina é administrada sob a forma de bólus com a duração de 5 min, o HIEC envolve a perfusão contínua de doses elevadas de insulina, o que contraria a secreção fisiológica pulsátil da insulina e conduz a uma inibição da secreção da HISS (Reid *et al.*, 2002). Para além disto está descrito que a hiperinsulinémia reduz o tónus vagal cardíaco (Van De Borne *et al.*, 1999), o que sugere que a infusão prolongada de insulina que ocorre durante o HIEC poderá também inibir o ramo hepático do vago, imprescindível para a secreção da HISS. Este facto poderá explicar em parte a descoberta tardia do mecanismo de potenciação da acção da insulina mediado pela HISS, visto que a técnica de referência para a avaliação da sensibilidade à insulina, o HIEC, não detecta esta componente da acção da insulina. Para além disto e, como já foi descrito, a acção da insulina dependente da HISS é máxima após uma refeição e torna-se praticamente insignificante após 24 h de jejum, sendo que em ratos metade deste decréscimo ocorre nas primeiras 6 h de jejum (Lautt *et al.*, 2001). É prática corrente que os estudos de avaliação da acção da insulina sejam executados no período de jejum, período este em que a contribuição da HISS para a sensibilidade à insulina é negligenciável. Por razões intrinsecamente ligadas à metodologia e aos protocolos experimentais utilizados, a existência da HISS foi ignorada pela comunidade científica ao longo de várias décadas.

Uma das falhas que tem sido apontada ao RIST é que este teste fornece apenas uma medida indirecta da acção da HISS, calculada através da subtracção do efeito hipoglicemiante da insulina em condições controlo e após bloqueio da componente da HISS. A HISS permanece por identificar o que impossibilita o desenvolvimento de um

ensaio biológico que quantifique directamente a sua acção, sendo que as evidências experimentais acumuladas ao longo de anos por vários grupos de trabalho tornam indubitável a existência deste factor humoral (Lautt, 1980; Moore *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 1994; Stumpel *et al.*, 1998; Hsieh *et al.*, 1999; Porszasz *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2005; Afonso *et al.*, 2007). A avaliação da componente da HISS através das suas propriedades farmacodinâmicas foi validada através da observação de que os parâmetros farmacocinéticos da insulina não são alterados pelos procedimentos farmacológicos e cirúrgicos que bloqueiam a secreção da HISS, nomeadamente em gatos (Xie *et al.*, 1995a), ratos (Lautt, observações não publicadas) e humanos (Patarrão, observações não publicadas), em que se observou que a administração de atropina não altera os níveis de insulina basal nem o valor máximo de insulina circulante após administração exógena da hormona. Outros grupos observaram que não ocorrem alterações nas propriedades farmacocinéticas da insulina após desnervação hepática em cães (Moore *et al.*, 2002), o que corrobora que a alteração na sensibilidade à insulina observada nestes animais não se deve a alterações nas propriedades farmacocinéticas da hormona, mas sim à inibição da secreção hepática da HISS.

Conclui-se que o RIST é a técnica mais indicada para avaliar a acção total da insulina, e em particular a acção da insulina dependente da HISS, uma vez que combina os pontos fortes do ITT e do HIEC: por um lado recorre à administração de um bólus de insulina que se aproxima mais da secreção fisiológica desta hormona e, por outro lado, sendo um teste euglicémico, evita a interferência das hormonas contrareguladoras. O RIST permite ainda a avaliação da sensibilidade à insulina tanto no estado de jejum como no estado pós-prandial.

## **8.2. DESVIO DE UM PARADIGMA. A RELEVÂNCIA DA HISS NA SENSIBILIDADE À INSULINA.**

A hipótese da HISS representa um desvio de um paradigma face ao entendimento clássico do que é a resistência à insulina. O aspecto mais inovador deste novo mecanismo passa pela constatação de que 50 a 60 % da acção hipoglicemiante atribuída à insulina é da responsabilidade deste factor humoral, secretado pelo fígado, que actua exclusivamente no músculo esquelético e no estado pós-prandial.

Por outro lado, a resistência à insulina tem sido tradicionalmente avaliada no estado de jejum em detrimento do estado pós-prandial. Compreende-se que a tendência no passado tenha sido a de utilizar o jejum como estado basal por excelência para o estudo do metabolismo, mas hoje em dia é cada vez mais evidente que as primeiras alterações no metabolismo ocorrem exactamente no estado pós-prandial, em que o desafio secretor à célula  $\beta$  é mais acentuado e a manutenção da homeostasia da glucose é mais exigente. A Associação Americana de Diabetes tem vindo a alertar para a necessidade premente de considerar os parâmetros metabólicos no estado pós-prandial para o diagnóstico da resistência à insulina e da diabetes tipo 2 (American Diabetes Association, 2001). Para isto, muito contribuíram os resultados obtidos nos estudos DCCT (Peterson *et al.*, 1995) e DECODE (Balkau, 1999) que destacam a necessidade de detecção e intervenção precoces na resistência à insulina de forma a evitar a evolução para uma diabetes franca, com a morbilidade e mortalidade que lhe estão associadas. Concluiu-se ainda que a utilização da glicémia em jejum como o único parâmetro para o diagnóstico da diabetes leva a um sub-diagnóstico da resistência à insulina, permitindo que indivíduos com hiperglicémia pós-prandial e glicémia em jejum normal não sejam detectados e intervencionados numa fase inicial da doença (Balkau, 1999; Leiter *et al.*, 2005).

A relevância do estado metabólico pós-prandial comparativamente ao estado de jejum na fisiopatologia da resistência à insulina tem sido amplamente demonstrada em

diversos estudos. Cerca de 33 % de doentes diagnosticados como tendo diabetes tipo 2 com base na hiperglicémia pós-prandial têm valores normais de glicémia em jejum (Leiter *et al.*, 2005). A relação entre a HbA1C e a glicémia foi estudada em diabéticos tipo 2, em diferentes alturas do dia, e observou-se que os níveis de HbA1C se correlacionavam melhor com a glicémia no período pós-prandial imediato do que com a glicémia em jejum (Avignon *et al.*, 1997). Também se verificou que o risco de mortalidade por doença cardiovascular devido à diabetes tipo 2 apresenta uma correlação muito mais forte com os níveis de glicémia durante uma PTGO do que com os níveis medidos em jejum (Balkau, 1999; Hanefeld *et al.*, 1999).

A acumulação de dados experimentais evidenciando o papel proeminente da regulação da glicémia pós-prandial na fisiopatologia da diabetes tipo 2 é um indicador da relevância fisiológica do mecanismo da HISS, cujo efeito sensibilizador da insulina mediado pelo fígado é controlado pelo estado prandial (Lautt *et al.*, 2001). Efectivamente, o efeito hipoglicémico de um bólus de insulina é máximo após uma refeição e diminui cerca de 55 % após um período de 24 h de jejum, devido à inibição da síntese da HISS. Assim, enquanto que alterações na acção da insulina observadas no estado de jejum se devem única e exclusivamente a defeitos na componente independente da HISS, a resistência à insulina que se observa no estado pós-prandial pode dever-se a alterações na secreção e/ou acção da HISS.

Os resultados apresentados neste trabalho revelam que a secreção da HISS depende da síntese de GSH e de NO no fígado. Foi descrito por vários investigadores que no estado pós-prandial ocorre um aumento tanto nos níveis de GSH hepático (Tateishi *et al.*, 1977) como na síntese de NO (Grongnet *et al.*, 2003). Este aumento nos níveis de GSH e NO no fígado que ocorrem imediatamente após uma refeição parece ser o sinal que inicia a síntese hepática da HISS. De acordo com esta hipótese, o jejum, o aumento do *stress* oxidativo, polimorfismos que limitem a actividade do NOS ou qualquer outro processo que induza uma diminuição do GSH e/ou NO hepáticos conduzirá a resistência



à insulina (Khamaisi *et al.*, 2000; Latour *et al.*, 2002; Guarino *et al.*, 2003; Ceriello *et al.*, 2004; Guarino *et al.*, 2004; Lautt, 2004). Considerando o trabalho apresentado conclui-se que a reposição dos níveis de NO e GSH hepáticos permite o restabelecimento da síntese/secreção da HISS e um aumento da sensibilidade à insulina.

O papel do NO hepático na libertação da HISS já era conhecido desde 1998 (Sadri *et al.*, 1998). O trabalho realizado nesta dissertação procurou esclarecer a via de sinalização pela qual o NO despoleta a secreção desta hormona, revelando alguns aspectos inéditos da fisiologia e fisiopatologia da secreção de NO no fígado.

Uma das hipóteses vigentes para o efeito do NO na sensibilidade à insulina é a de que o NO aumenta a sensibilidade à insulina devido às suas propriedades vasodilatadoras, aumentando o aporte de glucose e insulina aos tecidos alvo da insulina (Clark *et al.*, 2003). Os resultados apresentados contradizem esta hipótese, indicando que o efeito do NO na sensibilidade à insulina é localizado no fígado, sendo um efeito metabólico e não hemodinâmico, tal como discutido no capítulo 4. Mais ainda, nem todos os dadores de NO aumentam a sensibilidade à insulina, tendo-se observado que é necessária a administração de um dador de NO que mimetize a acção do NOS *in vivo*, ou seja, um dador de NO e  $O_2^{\bullet-}$ . O efeito potenciador do NO na sensibilidade à insulina só é observável caso as reservas hepáticas de GSH se encontrem intactas, o que sugere que o NO pode reagir com o GSH para formar uma espécie nitrosada.

Neste trabalho observou-se que a activação do GC hepático está envolvido na secreção da HISS pelo fígado. Ficou por esclarecer se a estimulação deste enzima ocorre directamente por activação do NOS hepático ou se, por outro lado, depende da formação de GSNO no fígado. Está descrito que os RSNOs podem activar o GC para estimular a síntese de GMPc (Schrammel *et al.*, 1998), o que sugere que a formação destas espécies químicas pode ocorrer a montante da síntese de GMPc na cascata de eventos intracelulares que conduz à formação da HISS. Embora o mecanismo pelo qual o GMPc modula a secreção da HISS não tenha sido extensivamente estudado neste

trabalho, está descrito que este segundo mensageiro activa o cinase dependente do GMPc (PKG) que está envolvido em processos de fosforilação e regulação de várias proteínas (Waldman *et al.*, 1987). Sabe-se que, nos hepatócitos, a via do NO/GC/PKG potencia a libertação de cálcio das reservas intracelulares através da fosforilação dos receptores do IP<sub>3</sub> (Guihard *et al.*, 1996), o que poderá sugerir um papel regulador desta via na secreção da HISS, através da mobilização do Ca<sup>2+</sup>.

Uma outra hipótese explicativa para o envolvimento da GC na secreção da HISS está relacionada com a via de transdução de sinal iniciada pela activação do adenilato ciclase, produção de AMPc e activação da PKA, que é um dos principais reguladores dos níveis de GSH hepático (Lu *et al.*, 1991). Está descrito que os hepatócitos expressam duas isoformas de fosfodiesterases específicos para o AMPc e regulados pelo GMPc (Beavo, 1995), que podem modular os níveis de GSH. Assim sendo, a inibição da síntese de GMPc influencia o GSH hepático através de *cross-talk* com o AMPc, representando mais um passo de controlo da secreção da HISS. A discussão desta hipótese é baseada num projecto a decorrer no laboratório da Professora Doutora Maria Paula Macedo.

Enquanto que vários autores apontam para um papel crucial do NO hepático na sensibilidade à insulina, existe ainda alguma controvérsia relativamente à origem deste NO. Porszasz *et al.* propõem que o NO envolvido na libertação da HISS é de origem nervosa sensorial, com base na observação de que a desnervação sensorial do plexo hepático anterior com capsaicina (Porszasz *et al.*, 2002) conduz a resistência à insulina da mesma magnitude da observada pelo nosso grupo, e também pelo grupo de Lautt, após inibição farmacológica do NOS (Sadri *et al.*, 1999; Guarino *et al.*, 2001; Guarino *et al.*, 2003). No entanto, Porszasz *et al.* utilizaram no seu trabalho ratos Wistar submetidos a um jejum de 24 h, o que, segundo os nossos resultados, corresponde a um estado de inibição total do mecanismo de sensibilização hepática da acção da insulina. Conclui-se que o efeito deletério da desnervação sensorial do plexo hepático anterior na sensibilidade à insulina é muito provavelmente independente do mecanismo da HISS. O NO hepático

envolvido na secreção da HISS provém da activação do NOS hepático, induzida pela activação dos nervos parassimpáticos hepáticos, que actuam através de receptores colinérgicos muscarínicos (Xie *et al.*, 1995b; Sadri *et al.*, 1999; Guarino *et al.*, 2004).

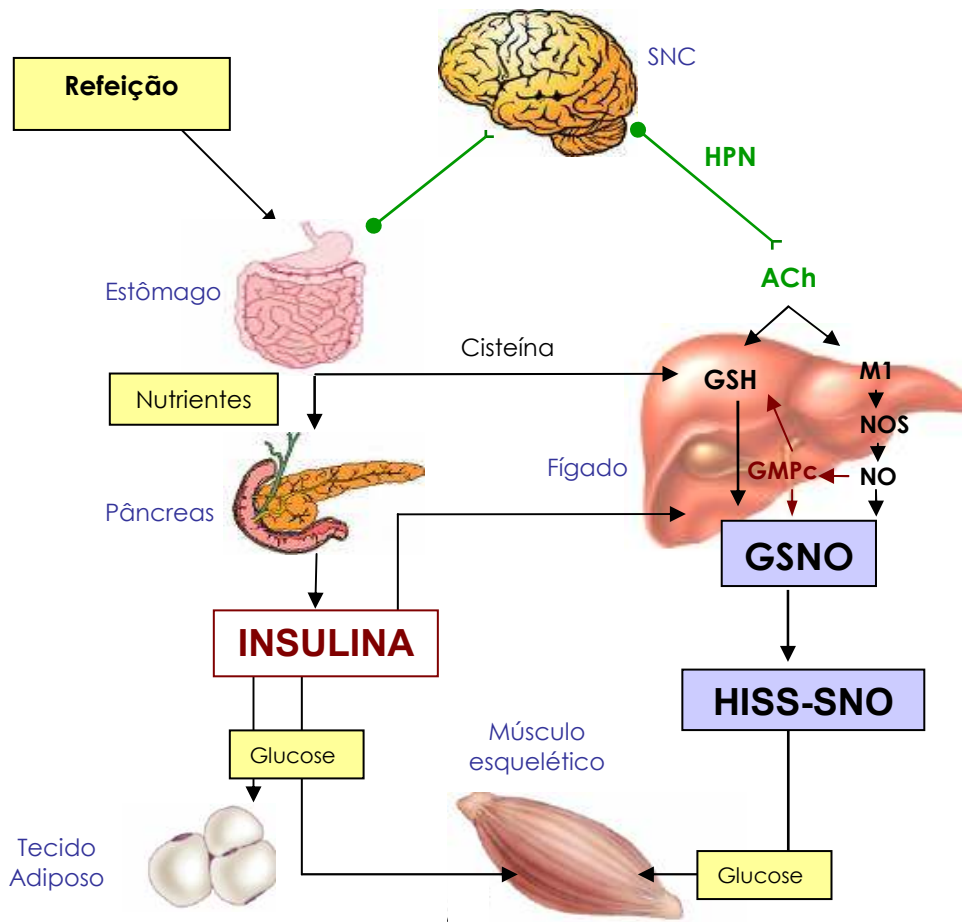
Um outro aspecto importante deste trabalho prende-se com a observação de que o GSH produzido no fígado tem um papel preponderante na acção da insulina no estado pós-prandial, que é independente da sua acção anti-oxidante. A diminuição de GSH observada na diabetes tipo 2 tem sido interpretada à luz da teoria dos radicais livres, segundo a qual a hiperglicémia observada na diabetes tipo 2 conduz a um aumento da formação de radicais livres e, indirectamente, à depleção de reservas anti-oxidantes (Ceriello *et al.*, 2004). No entanto os resultados sugerem que a depleção do GSH hepático pode, por si só, diminuir a sensibilidade à insulina sem que haja aumento da produção de radicais livres, resultados estes suportados pelas observações de Khamaisi *et al.*, em que o mesmo protocolo experimental de depleção de GSH utilizado neste trabalho induziu intolerância à glucose em ratos sem alterar parâmetros relacionados com o *stress* oxidativo (Khamaisi *et al.*, 2000). Este autor verificou que a tolerância diminuída à glucose observada não se podia atribuir a alterações na acção da insulina (avaliada pela captação de 2-desoxiglucose *in vitro*) nem na sua secreção pelo pâncreas, concluindo que haveria outro mecanismo através do qual a depleção de GSH conduziu a intolerância à glucose (Khamaisi *et al.*, 2000). Em conjunto estas observações apontam, pela primeira vez, para uma nova função deste tiol não proteico, não como anti-oxidante mas como regulador metabólico e suportam a hipótese de que o aumento da concentração hepática de GSH, que ocorre na transição do estado de jejum para o estado pós-prandial, participa no sinal prandial que regula a libertação da HISS pelo fígado (Guarino *et al.*, 2003; Guarino *et al.*, 2006).

### 8.3. A NATUREZA QUÍMICA DA HISS

Conclui-se deste trabalho que a administração de RSNOs tem potencial terapêutico no tratamento da resistência à insulina em situações em que haja, à partida, inibição da componente da HISS, tais como a resistência à insulina induzida pela dieta (Ribeiro *et al.*, 2005), insuficiência hepática (Lautt *et al.*, 1998b), obesidade (Ribeiro *et al.*, 2001a) e hipertensão (Afonso *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos vieram demonstrar que existe um aumento da sensibilidade à insulina quando se administram RSNOs no estado de jejum. Contudo, este aumento só é estatisticamente significativo se a administração for efectuada a nível sistémico. Os resultados indicam que os RSNOs actuam no músculo esquelético para aumentar a captação de glucose, através de um mecanismo ainda por esclarecer. Estas espécies químicas poderão S-nitrosar enzimas chave envolvidos na regulação da captação da glucose tais como o hexocinase ou o AMPK. Está descrito que o AMPK é activado pelo NO (Shearer *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005), levando a um aumento da entrada de glucose para as células, independentemente dos níveis de AMP intracelular (Zou *et al.*, 2003). Estas observações contrariam a perspectiva tradicional de que o AMPK é apenas um sensor metabólico de *stress* e de escassez, e colocam esta enzima na linha da frente como candidato a mediador intracelular da acção da HISS no músculo esquelético.

No estado pós-prandial, em que a via de libertação/síntese da HISS é máxima, a administração sistémica de RSNOs induz resistência à insulina, o que sugere a existência de uma regulação muito fina da sensibilidade à insulina pelos RSNOs. Parece haver um mecanismo de retroacção negativa que regula a acção periférica da HISS quando há um aumento de moléculas mimetizadoras da sua acção em circulação. Estas observações sugerem fortemente que a natureza química da HISS é um nitrosotiol, o que é representado no mecanismo geral da acção da HISS apresentado na figura 8.1.



**Figura 8.1:** A hipótese da HISS: A ingestão de uma refeição sinaliza o sistema nervoso central (SNC) para activar os nervos parassimpáticos hepáticos (HPN), levando à libertação de acetilcolina (ACh) no fígado que, por sua vez estimula os receptores muscarínicos do tipo M1 para activar o sintase do monóxido de azoto (NOS). Simultaneamente, o aumento da disponibilidade do aminoácido cisteína no sangue portal aumenta os níveis de GSH hepático. O monóxido de azoto (NO) hepático reage com o GSH para formar um composto nitrosado, o S-nitrosoglutatão, podendo ainda activar o guanilato ciclase que, levando à formação de GMPc, modula a libertação da HISS para a corrente sanguínea. A HISS actua exclusivamente no músculo esquelético sendo responsável por cerca de 55 % da acção hipoglicemiante da insulina no organismo. O mecanismo pelo qual a HISS potencia a captação de glucose no músculo esquelético é ainda desconhecido. Se a função parassimpática, a produção de NO hepático ou os níveis de GSH no fígado estiverem diminuídos, a captação de glucose mediada pela insulina diminui em 55 % devido ao bloqueio da síntese da HISS.

#### **8.4. A VIA DA HISS COMO ALVO TERAPÊUTICO**

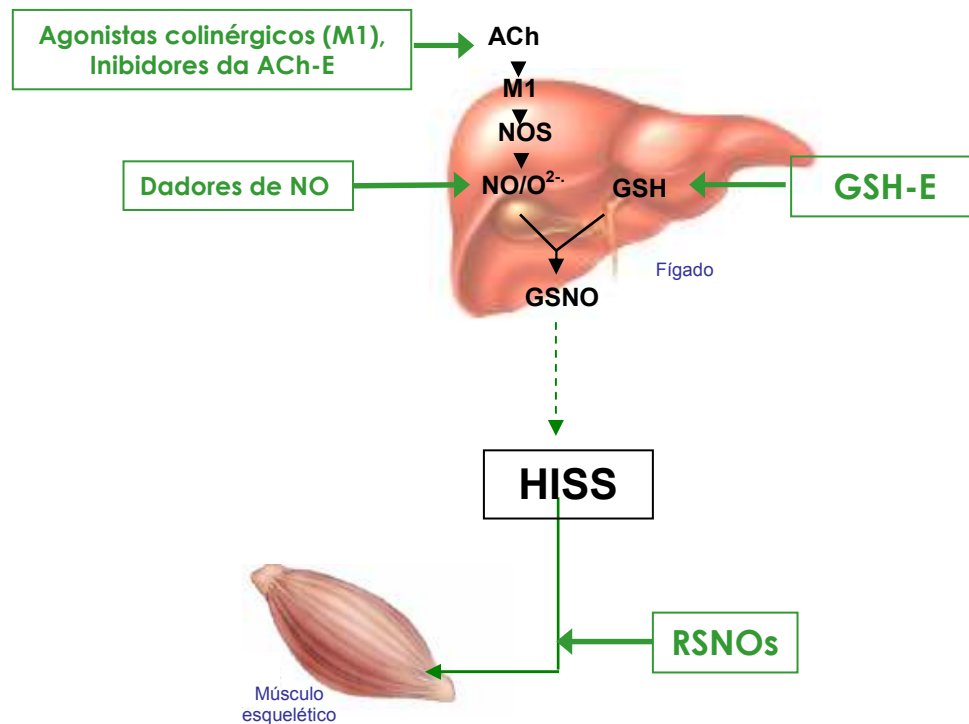
Em artigos de revisão recentes tem sido enfaticamente sublinhado que muitas das abordagens terapêuticas para a diabetes tipo 2 e a síndrome metabólica foram desenvolvidas na ausência de alvos moleculares definidos e com uma fraca compreensão da fisiopatologia das doenças (Brownlee, 2005). A terapêutica actual possui eficácia e tolerância limitadas, e efeitos secundários significativos, nomeadamente associados ao ganho de peso ou a episódios de hipoglicémia. É urgente e necessário que surjam novas abordagens ao problema da terapêutica da resistência à insulina, nomeadamente na concertação entre o estudo dos mecanismos fisiopatológicos que lhe estão subjacentes e o design de novos fármacos. O estudo da fisiologia e patologia do mecanismo de controlo da captação de glucose pela HISS representa uma abordagem revolucionária em termos de novos alvos terapêuticos para restaurar a sensibilidade à insulina no músculo esquelético.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o papel dos nervos parassimpáticos hepáticos na sensibilização da acção da insulina está intimamente ligado à produção de NO no fígado. Em termos farmacológicos, este trabalho sugere que os dadores de NO podem ter indicação terapêutica nos casos de resistência à insulina dependente da HISS associada com a neuropatia hepática ou com alterações na síntese hepática de NO. O uso exclusivo de agonistas muscarínicos não foi eficaz na reversão da resistência à insulina secundária a alterações na síntese de NO, embora esteja descrito na literatura que, tal como os inibidores do acetilcolinesterase (ACh-E), poderão representar uma mais-valia terapêutica nos casos de neuropatias do ramo hepático do vago (Xie *et al.*, 1996a).

Nos casos em que a síntese da HISS se encontra diminuída devido a alterações na síntese de GSH hepático e de NO hepático, a abordagem terapêutica a considerar será a co-administração de dadores de GSH e de NO. Os resultados obtidos após a

administração conjunta de GSH e NO a ratos em jejum, mostraram uma potenciação da acção periférica da insulina induzida por estes compostos, o que indica que esta associação farmacológica poderá representar uma nova perspectiva na terapêutica da resistência à insulina dependente da HISS.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os RSNOs mimetizam a acção da HISS no músculo esquelético, em situações em que a secreção deste factor humoral esteja à partida comprometida. Uma possível abordagem terapêutica a situações em que haja um comprometimento da secreção da HISS pelo fígado passa pela administração de RSNOs em doses baixas, uma vez que doses altas destes compostos poderão inibir a via da HISS por um mecanismo de retroacção negativa, sendo ainda responsáveis pela inibição da via de transdução de sinal do receptor de insulina (Carvalho-Filho *et al.*, 2005; Badal *et al.*, 2006; McGrowder *et al.*, 2006b) As potenciais intervenções terapêuticas na via da HISS encontram-se esquematizadas na figura 8.2



**Figura 8.2:** Potenciais intervenções terapêuticas na via da HISS. Em situações de resistência à insulina dependente da HISS induzidas por neuropatias do parassimpático hepático, a administração de agonistas muscarínicos com elevada especificidade para os receptores do tipo M1 poderá reverter a inibição da secreção da HISS. Uma outra abordagem passa pela utilização de inibidores da acetilcolinesterase (ACh-E), que aumentam os níveis de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. Caso a alteração fisiopatológica seja na produção de monóxido de azoto (NO) hepático, os agonistas colinérgicos não representam alternativa terapêutica e terão que ser utilizados dadores de NO. Nas situações em que a inibição da secreção da HISS se deve a uma diminuição dos níveis de glutathione hepático, podem ser utilizados fármacos dadores de GSH. A administração periférica de RSNOs mimetiza a acção da HISS no músculo esquelético em situações em que a secreção da hormona está diminuída.

Devido à complexidade da via de sinalização que conduz à síntese da HISS, a abordagem farmacológica da resistência à insulina dependente da HISS tem que considerar o mecanismo fisiopatológico que lhe está subjacente. É altamente improvável que as alterações na via da HISS descritas em diversos modelos animais patológicos, incluindo o modelo de colestase (Lautt *et al.*, 1998b), resistência à insulina (Ribeiro *et al.*,



2005), obesidade (Afonso *et al.*, 2007), hipertensão (Afonso *et al.*, 2004; Ribeiro *et al.*, 2007), exposição pré-natal ao álcool (Sadri *et al.*, 2005) e num modelo de envelhecimento (Ribeiro & Macedo, observações não publicadas) sejam provocadas por um único defeito na via de sinalização. É igualmente improvável que a resistência à insulina dependente da HISS que se observa nestes modelos patológicos seja passível de ser tratada através de um único alvo terapêutico: para que o tratamento seja eficaz, será necessário avaliar a sua etiologia de forma a identificar a causa primária e, eventualmente, considerar a utilização de fármacos compostos caso exista um comprometimento multi-factorial na via de sinalização da HISS.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- ADKINS, B.A., MYERS, S.R., HENDRICK, G.K., STEVENSON, R.W., WILLIAMS, P.E. & CHERRINGTON, A.D. **(1987)**. Importance of the route of intravenous glucose delivery to hepatic glucose balance in the conscious dog. *J Clin Invest*, 79, 557-65.
- ADKINS-MARSHALL, B., PAGLIASSOTTI, M.J., ASHER, J.R., CONNOLLY, C.C., NEAL, D.W., WILLIAMS, P.E., MYERS, S.R., HENDRICK, G.K., ADKINS, R.B., JR. & CHERRINGTON, A.D. **(1992)**. Role of hepatic nerves in response of liver to intraportal glucose delivery in dogs. *Am J Physiol*, 262, E679-86.
- AFONSO, R.A., RIBEIRO, R.T. & MACEDO, M.P. **(2004)**. Defective hepatic nitric oxide action results in HISS-dependent insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Proc West Pharmacol Soc*, 47, 103-4.
- AFONSO, R.A., RIBEIRO, R.T., FERNANDES, A.B., PATARRAO, R.S. & MACEDO, M.P. **(2007)**. Hepatic-dependent and -independent insulin actions are impaired in the obese Zucker rat model. *Obesity (Silver Spring)*, 15, 314-21.
- AKERSTROM, G., LUNDIN, S. & LISANDER, B. **(1989)**. Decrease in plasma volume from intraabdominal trauma in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*, 33, 272-6.
- ALESSI, D.R. & DOWNES, C.P. **(1998)**. The role of PI 3-kinase in insulin action. *Biochim Biophys Acta*, 1436, 151-64.
- AL-SA'DONI, H.H. & FERRO, A. **(2004)**. S-nitrosothiols as nitric oxide-donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications. *Curr Med Chem*, 11, 2679-90.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION **(2001)**. Postprandial Blood Glucose. *Diabetes Care*, 24, 775-778.
- AN, P., FREEDMAN, B.I., HANIS, C.L., CHEN, Y.D., WEDER, A.B., SCHORK, N.J., BOERWINKLE, E., PROVINCE, M.A., HSIUNG, C.A., WU, X., QUERTERMOUS, T. & RAO, D.C. **(2005)**. Genome-wide linkage scans for fasting glucose, insulin, and insulin resistance in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Blood Pressure Program: evidence of linkages to chromosome 7q36 and 19q13 from meta-analysis. *Diabetes*, 54, 909-14.
- ANDERSON, M.E. & MEISTER, A. **(1989)**. Glutathione monoesters. *Anal Biochem*, 183, 16-20.
- ANDERSSON, U., FILIPSSON, K., ABBOTT, C.R., WOODS, A., SMITH, K., BLOOM, S.R., CARLING, D. & SMALL, C.J. **(2004)**. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*, 279, 12005-8.
- ASHWELL, M., STIRLING, D., FREEMAN, S. & HOLLOWAY, B.R. **(1987)**. Immunological, histological and biochemical assessment of brown adipose tissue activity in neonatal, control and beta-stimulant-treated adult dogs. *Int J Obes*, 11, 357-65.

- AVIGNON, A., RADAUCEANU, A. & MONNIER, L. **(1997)**. Nonfasting plasma glucose is a better marker of diabetic control than fasting plasma glucose in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 20, 1822-6.
- BADAL, S., BROWN, P.D. & RAGOOBIRSINGH, D. **(2006)**. Nitric oxide agents impair insulin-mediated signal transduction in rat skeletal muscle. *BMC Biochem*, 7, 17.
- BALKAU, B. **(1999)**. New diagnostic criteria for diabetes and mortality in older adults. DECODE Study Group. European Diabetes Epidemiology Group. *Lancet*, 353, 68-9.
- BALON, T.W. & NADLER, J.L. **(1994)**. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol*, 77, 2519-21.
- BALON, T.W. & NADLER, J.L. **(1997)**. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol*, 82, 359-63.
- BANKS, W.A. **(2004)**. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol*, 490, 5-12.
- BARG, S. & RORSMAN, P. **(2004)**. Insulin secretion: a high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  sensor after all? *J Gen Physiol*, 124, 623-5.
- BARON, A.D., STEINBERG, H.O., CHAKER, H., LEAMING, R., JOHNSON, A. & BRECHTEL, G. **(1995)**. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation contributes to both insulin sensitivity and responsiveness in lean humans. *J Clin Invest*, 96, 786-92.
- BARON, A.D. **(1996)**. Insulin and the vasculature--old actors, new roles. *J Invest Med*, 44, 406-12.
- BASKIN, D.G., FIGLEWICZ LATTEMANN, D., SEELEY, R.J., WOODS, S.C., PORTE, D., JR. & SCHWARTZ, M.W. **(1999)**. Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res*, 848, 114-23.
- BASU, A., BASU, R., SHAH, P., VELLA, A., JOHNSON, C.M., JENSEN, M., NAIR, K.S., SCHWENK, W.F. & RIZZA, R.A. **(2001)**. Type 2 diabetes impairs splanchnic uptake of glucose but does not alter intestinal glucose absorption during enteral glucose feeding: additional evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes*, 50, 1351-62.
- BATES, J.N., BAKER, M.T., GUERRA, R., JR. & HARRISON, D.G. **(1991)**. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. *Biochem Pharmacol*, 42 Suppl, S157-65.
- BAUMANN, C.A., RIBON, V., KANZAKI, M., THURMOND, D.C., MORA, S., SHIGEMATSU, S., BICKEL, P.E., PESSIN, J.E. & SALTIEL, A.R. **(2000)**. CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*, 407, 202-7.
- BEAVO, J.A. **(1995)**. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*, 75, 725-48.

- BELLAMY, T.C. & GARTHWAITE, J. **(2001)**. "cAMP-specific" phosphodiesterase contributes to cGMP degradation in cerebellar cells exposed to nitric oxide. *Mol Pharmacol*, 59, 54-61.
- BERGERON, R., PREVIS, S.F., CLINE, G.W., PERRET, P., RUSSELL, R.R., 3RD, YOUNG, L.H. & SHULMAN, G.I. **(2001)**. Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats. *Diabetes*, 50, 1076-82.
- BERGMAN, R.N., BEIR, J.R. & HOURIGAN, P.M. **(1982)**. Intraportal glucose infusion matched to oral glucose absorption. Lack of evidence for "gut factor" involvement in hepatic glucose storage. *Diabetes*, 31, 27-35.
- BERGMAN, R.N., FINEGOOD, D.T. & ADER, M. **(1985)**. Assessment of insulin sensitivity in vivo. *Endocr Rev*, 6, 45-86.
- BERGSTEN, P. **(2000)**. Pathophysiology of impaired pulsatile insulin release. *Diabetes Metab Res Rev*, 16, 179-91.
- BEST, J.D., TABORSKY, G.J., JR., FLATNESS, D.E. & HALTER, J.B. **(1984)**. Effect of pentobarbital anesthesia on plasma norepinephrine kinetics in dogs. *Endocrinology*, 115, 853-7.
- BIHLER, I., PRAYAG, R. & SAWH, P.C. **(1987)**. Influence of cell isolation and incubation procedures on Ca<sup>2+</sup> dependence of glucose transport in isolated cardiac myocytes. *Can J Cardiol*, 3, 23-32.
- BLAIR, A.S., HAJDUCH, E., LITHERLAND, G.J. & HUNDAL, H.S. **(1999)**. Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem*, 274, 36293-9.
- BLOCH-DAMTI, A. & BASHAN, N. **(2005)**. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, 7, 1553-67.
- BLUHER, M., KAHN, B.B. & KAHN, C.R. **(2003)**. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*, 299, 572-4.
- BOGDAN, C. **(2001)**. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2, 907-16.
- BOHLEN, H.G. & NASE, G.P. **(2002)**. Obesity lowers hyperglycemic threshold for impaired in vivo endothelial nitric oxide function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H391-7.
- BONADONNA, R.C., SACCOMANI, M.P., SEELY, L., ZYCH, K.S., FERRANNINI, E., COBELLI, C. & DEFRONZO, R.A. **(1993)**. Glucose transport in human skeletal muscle. The in vivo response to insulin. *Diabetes*, 42, 191-8.
- BORGHOUTS, L.B. & KEIZER, H.A. **(2000)**. Exercise and insulin sensitivity: a review. *Int J Sports Med*, 21, 1-12.

- BRADLEY, S.J., KINGWELL, B.A. & MCCONELL, G.K. **(1999)**. Nitric oxide synthase inhibition reduces leg glucose uptake but not blood flow during dynamic exercise in humans. *Diabetes*, 48, 1815-21.
- BROWNLEE, M. **(2005)**. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54, 1615-25.
- BRUNING, J.C., MICHAEL, M.D., WINNAY, J.N., HAYASHI, T., HORSCH, D., ACCILI, D., GOODYEAR, L.J. & KAHN, C.R. **(1998)**. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*, 2, 559-69.
- BRUNING, J.C., GAUTAM, D., BURKS, D.J., GILLETTE, J., SCHUBERT, M., ORBAN, P.C., KLEIN, R., KRONE, W., MULLER-WIELAND, D. & KAHN, C.R. **(2000)**. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, 289, 2122-5.
- BRYAN, N.S., RASSAF, T., MALONEY, R.E., RODRIGUEZ, C.M., SAIJO, F., RODRIGUEZ, J.R. & FEELISCH, M. **(2004)**. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4308-13.
- BRYANT, N.J., GOVERS, R. & JAMES, D.E. **(2002)**. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 267-77.
- BURCELIN, R., DOLCI, W. & THORENS, B. **(2000)**. Portal glucose infusion in the mouse induces hypoglycemia: evidence that the hepatoportal glucose sensor stimulates glucose utilization. *Diabetes*, 49, 1635-42.
- BURCELIN, R., CRIVELLI, V., PERRIN, C., DA COSTA, A., MU, J., KAHN, B.B., BIRNBAUM, M.J., KAHN, C.R., VOLLENWEIDER, P. & THORENS, B. **(2003)**. GLUT4, AMP kinase, but not the insulin receptor, are required for hepatoportal glucose sensor-stimulated muscle glucose utilization. *J Clin Invest*, 111, 1555-62.
- CABRERO, A., LAGUNA, J.C. & VAZQUEZ, M. **(2002)**. Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1, 243-8.
- CARLSON, C.J., KOTERSKI, S., SCIOTTI, R.J., POCCARD, G.B. & RONDINONE, C.M. **(2003)**. Enhanced basal activation of mitogen-activated protein kinases in adipocytes from type 2 diabetes: potential role of p38 in the downregulation of GLUT4 expression. *Diabetes*, 52, 634-41.
- CARVALHO-FILHO, M.A., UENO, M., HIRABARA, S.M., SEABRA, A.B., CARVALHEIRA, J.B., DE OLIVEIRA, M.G., VELLOSO, L.A., CURI, R. & SAAD, M.J. **(2005)**. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes*, 54, 959-67.
- CEDERBERG, A. & ENERBACK, S. **(2003)**. Insulin resistance and type 2 diabetes--an adipocentric view. *Curr Mol Med*, 3, 107-25.

- CERIELLO, A. **(1997)**. Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. *Diabet Med*, 14 Suppl 3, S45-9.
- CERIELLO, A. & MOTZ, E. **(2004)**. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 816-23.
- CHEATHAM, B., VLAHOS, C.J., CHEATHAM, L., WANG, L., BLENIS, J. & KAHN, C.R. **(1994)**. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol*, 14, 4902-11.
- CHEN, Z.P., MITCHELHILL, K.I., MICHELL, B.J., STAPLETON, D., RODRIGUEZ-CRESPO, I., WITTERS, L.A., POWER, D.A., ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. & KEMP, B.E. **(1999)**. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett*, 443, 285-9.
- CHERRINGTON, A.D., STEVENSON, R.W. & STEINER, K.E. **(1987)**. Glucagon as a regulator of hepatic glucose production in vivo. *Biochem Soc Trans*, 15, 1023-7.
- CHOI, C.S., KIM, Y.B., LEE, F.N., ZABOLOTNY, J.M., KAHN, B.B. & YOUN, J.H. **(2002)**. Lactate induces insulin resistance in skeletal muscle by suppressing glycolysis and impairing insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 283, E233-40.
- CHOU, H.F., MCGIVERN, R., BERMAN, N. & IPP, E. **(1991)**. Oscillations of circulating plasma insulin concentrations in the rat. *Life Sci*, 48, 1463-9.
- CHUNG, K.K., THOMAS, B., LI, X., PLETNIKOVA, O., TRONCOSO, J.C., MARSH, L., DAWSON, V.L. & DAWSON, T.M. **(2004)**. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science*, 304, 1328-31.
- CLARK, M.G., COLQUHOUN, E.Q., RATTIGAN, S., DORA, K.A., ELDERSHAW, T.P., HALL, J.L. & YE, J. **(1995)**. Vascular and endocrine control of muscle metabolism. *Am J Physiol*, 268, E797-812.
- CLARK, M.G., WALLIS, M.G., BARRETT, E.J., VINCENT, M.A., RICHARDS, S.M., CLERK, L.H. & RATTIGAN, S. **(2003)**. Blood flow and muscle metabolism: a focus on insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284, E241-58.
- COLLINS, F.M. **(2002)**. Current treatment approaches to type 2 diabetes mellitus: successes and shortcomings. *Am J Manag Care*, 8, S460-71.
- CONSOLI, A., NURJHAN, N., REILLY, J.J., JR., BIER, D.M. & GERICH, J.E. **(1990)**. Mechanism of increased gluconeogenesis in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of alterations in systemic, hepatic, and muscle lactate and alanine metabolism. *J Clin Invest*, 86, 2038-45.
- CONSOLI, A., NURJAHAN, N., GERICH, J.E. & MANDARINO, L.J. **(1992)**. Skeletal muscle is a major site of lactate uptake and release during hyperinsulinemia. *Metabolism*, 41, 176-9.

- CREUTZFELDT, W. **(1979)**. The incretin concept today. *Diabetologia*, 16, 75-85.
- DAWSON, P.A., MYCHALECKYJ, J.C., FOSSEY, S.C., MIHIC, S.J., CRADDOCK, A.L. & BOWDEN, D.W. **(2001)**. Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab*, 74, 186-99.
- DE MATTIA, G., BRAVI, M.C., LAURENTI, O., CASSONE-FALDETTA, M., ARMIENTO, A., FERRI, C. & BALSANO, F. **(1998)**. Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 47, 993-7.
- DEFRONZO, R.A., FERRANNINI, E., HENDLER, R., WAHREN, J. & FELIG, P. **(1978)**. Influence of hyperinsulinemia, hyperglycemia, and the route of glucose administration on splanchnic glucose exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 5173-7.
- DEFRONZO, R.A., TOBIN, J.D. & ANDRES, R. **(1979)**. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*, 237, E214-23.
- DEFRONZO, R.A. & FERRANNINI, E. **(1991)**. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*, 14, 173-94.
- DEFRONZO, R.A. **(1997)**. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth J Med*, 50, 191-7.
- DIEHL, K.H., HULL, R., MORTON, D., PFISTER, R., RABEMAMPIANINA, Y., SMITH, D., VIDAL, J.M. & VAN DE VORSTENBOSCH, C. **(2001)**. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*, 21, 15-23.
- DONMEZ, G., DERICI, U., ERBAS, D., ARINSOY, T., ONK, A., SINDEL, S. & HASANOGLU, E. **(2002)**. The effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension. *Jpn J Physiol*, 52, 435-40.
- DOYLE, M.E. & EGAN, J.M. **(2003)**. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev*, 55, 105-31.
- DRESNER, A., LAURENT, D., MARCUCCI, M., GRIFFIN, M.E., DUFOUR, S., CLINE, G.W., SLEZAK, L.A., ANDERSEN, D.K., HUNDAL, R.S., ROTHMAN, D.L., PETERSEN, K.F. & SHULMAN, G.I. **(1999)**. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*, 103, 253-9.
- DUNPHY, J.L., TAYLOR, R.G. & FULLER, P.J. **(1998)**. Tissue distribution of rat glucagon receptor and GLP-1 receptor gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, 141, 179-86.
- EBELING, P., BOUREY, R., KORANYI, L., TUOMINEN, J.A., GROOP, L.C., HENRIKSSON, J., MUECKLER, M., SOVIJARVI, A. & KOIVISTO, V.A. **(1993)**. Mechanism of enhanced insulin sensitivity in

- athletes. Increased blood flow, muscle glucose transport protein (GLUT-4) concentration, and glycogen synthase activity. *J Clin Invest*, 92, 1623-31.
- ELBEIN, S.C., HOFFMAN, M.D., TENG, K., LEPPERT, M.F. & HASSTEDT, S.J. **(1999)**. A genome-wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in Utah Caucasians. *Diabetes*, 48, 1175-82.
- ETGEN, G.J., JR., JENSEN, J., WILSON, C.M., HUNT, D.G., CUSHMAN, S.W. & IVY, J.L. **(1997a)**. Exercise training reverses insulin resistance in muscle by enhanced recruitment of GLUT-4 to the cell surface. *Am J Physiol*, 272, E864-9.
- ETGEN, G.J., JR., FRYBURG, D.A. & GIBBS, E.M. **(1997b)**. Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes*, 46, 1915-9.
- EU, J.P., SUN, J., XU, L., STAMLER, J.S. & MEISSNER, G. **(2000)**. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sub>2</sub> sensor and NO signaling functions. *Cell*, 102, 499-509.
- EVANS, J.L., MADDUX, B.A. & GOLDFINE, I.D. **(2005)**. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*, 7, 1040-52.
- EWIS, S.A. & ABDEL-RAHMAN, M.S. **(1997)**. Influence of atenolol and/or metformin on glutathione and magnesium levels in diabetic rats. *J Appl Toxicol*, 17, 409-13.
- FAJANS, S.S., BELL, G.I. & POLONSKY, K.S. **(2001)**. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*, 345, 971-80.
- FEDERSPIL, G., ZACCARIA, M., PEDRAZZOLI, S., ZAGO, E., DEPALO, C. & SCANDELLARI, C. **(1980)**. Effects of sodium DL-lactate on insulin secretion in anesthetized dogs. *Diabetes*, 29, 33-6.
- FEELISCH, M. & NOACK, E. **(1987)**. Nitric oxide (NO) formation from nitrovasodilators occurs independently of hemoglobin or non-heme iron. *Eur J Pharmacol*, 142, 465-9.
- FEELISCH, M. **(1993)**. Biotransformation to nitric oxide of organic nitrates in comparison to other nitrovasodilators. *Eur Heart J*, 14 Suppl I, 123-32.
- FERRANNINI, E., LOCATELLI, L., JEQUIER, E. & FELBER, J.P. **(1989)**. Differential effects of insulin and hyperglycemia on intracellular glucose disposition in humans. *Metabolism*, 38, 459-65.
- FERRANNINI, E., KATZ, L.D., GLICKMAN, M.G. & DEFRONZO, R.A. **(1990)**. Influence of combined intravenous and oral glucose administration on splanchnic glucose uptake in man. *Clin Physiol*, 10, 527-38.
- FERRANTI, P., MALORNI, A., MAMONE, G., SANNOLO, N. & MARINO, G. **(1997)**. Characterisation of S-nitrosohaemoglobin by mass spectrometry. *FEBS Lett*, 400, 19-24.
- FOSTER, M.W., MCMAHON, T.J. & STAMLER, J.S. **(2003)**. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med*, 9, 160-8.



- FU, W.J., HAYNES, T.E., KOHLI, R., HU, J., SHI, W., SPENCER, T.E., CARROLL, R.J., MEININGER, C.J. & WU, G. **(2005)**. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J Nutr*, 135, 714-21.
- GAO, Z., YOUNG, R.A., TRUCCO, M.M., GREENE, S.R., HEWLETT, E.L., MATSCHINSKY, F.M. & WOLF, B.A. **(2002)**. Protein kinase A translocation and insulin secretion in pancreatic beta-cells: studies with adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Biochem J*, 368, 397-404.
- GARDEMANN, A., STRULIK, H. & JUNGGERMANN, K. **(1986)**. A portal-arterial glucose concentration gradient as a signal for an insulin-dependent net glucose uptake in perfused rat liver. *FEBS Lett*, 202, 255-9.
- GARTHWAITE, J. & BOULTON, C.L. **(1995)**. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 57, 683-706.
- GEROZISSIS, K., OROSCO, M., ROUCH, C. & NICOLAIDIS, S. **(1997)**. Insulin responses to a fat meal in hypothalamic microdialysates and plasma. *Physiol Behav*, 62, 767-72.
- GEROZISSIS, K. **(2003)**. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol*, 23, 1-25.
- GODSLAND, I.F., BRUCE, R., JEFFS, J.A., LEYVA, F., WALTON, C. & STEVENSON, J.C. **(2004)**. Inflammation markers and erythrocyte sedimentation rate but not metabolic syndrome factor score predict coronary heart disease in high socioeconomic class males: the HDDRISC study. *Int J Cardiol*, 97, 543-50.
- GOLDSTEIN, B.J., AHMAD, F., DING, W., LI, P.M. & ZHANG, W.R. **(1998)**. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem*, 182, 91-9.
- GOODNER, C.J., WALIKE, B.C., KOERKER, D.J., ENSINCK, J.W., BROWN, A.C., CHIDECKEL, E.W., PALMER, J. & KALNASY, L. **(1977)**. Insulin, glucagon, and glucose exhibit synchronous, sustained oscillations in fasting monkeys. *Science*, 195, 177-9.
- GOULD, G.W., THOMAS, H.M., JESS, T.J. & BELL, G.I. **(1991)**. Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry*, 30, 5139-45.
- GOW, A.J. & STAMLER, J.S. **(1998)**. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature*, 391, 169-73.
- GRATTAGLIANO, I., WIELAND, P., SCHRANZ, C. & LAUTERBURG, B.H. **(1995)**. Disposition of glutathione monoethyl ester in the rat: glutathione ester is a slow release form of extracellular glutathione. *J Pharmacol Exp Ther*, 272, 484-8.
- GRONGNET, J.F. & DAVID, J.C. **(2003)**. Reciprocal variations of nNOS and HSP90 are associated with fasting in gastrointestinal tract of the piglet. *Dig Dis Sci*, 48, 365-72.

- GRUBB, B. & SNARR, J.F. **(1977)**. Effect of flow rate and glucose concentration on glucose uptake rate by the rat limb. *Proc Soc Exp Biol Med*, 154, 33-6.
- GUARINO, M.P., CORREIA, N.C., RAPOSO, J. & MACEDO, M.P. **(2001)**. Nitric oxide synthase inhibition decreases output of hepatic insulin sensitizing substance (HISS), which is reversed by SIN-1 but not by nitroprusside. *Proc West Pharmacol Soc*, 44, 25-6.
- GUARINO, M.P., AFONSO, R.A., RAIMUNDO, N., RAPOSO, J.F. & MACEDO, M.P. **(2003)**. Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284, G588-94.
- GUARINO, M.P., CORREIA, N.C., LAUTT, W.W. & MACEDO, M.P. **(2004)**. Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G527-32.
- GUARINO, M.P. & MACEDO, M.P. **(2006)**. Co-administration of glutathione and nitric oxide enhances insulin sensitivity in Wistar rats. *Br J Pharmacol*, 147, 959-65.
- GUIHARD, G., COMBETTES, L. & CAPIOD, T. **(1996)**. 3':5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) potentiates the inositol 1,4,5-trisphosphate-evoked Ca<sup>2+</sup> release in guinea-pig hepatocytes. *Biochem J*, 318 ( Pt 3), 849-55.
- GUPTA, A. & MORA, S. **(2006)**. Activation of the Cbl insulin signaling pathway in cardiac muscle; dysregulation in obesity and diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, 342, 751-7.
- HAFFNER, S.M. **(2003)**. Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am J Cardiol*, 92, 18J-26J.
- HALLSTROM, S., GASSER, H., NEUMAYER, C., FUGL, A., NANOBASHVILI, J., JAKUBOWSKI, A., HUK, I., SCHLAG, G. & MALINSKI, T. **(2002)**. S-nitroso human serum albumin treatment reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle via nitric oxide release. *Circulation*, 105, 3032-8.
- HANEFELD, M., KOEHLER, C., SCHAPER, F., FUECKER, K., HENKEL, E. & TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T. **(1999)**. Postprandial plasma glucose is an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in non-diabetic individuals. *Atherosclerosis*, 144, 229-35.
- HANIS, C.L., BOERWINKLE, E., CHAKRABORTY, R., ELLSWORTH, D.L., CONCANNON, P., STIRLING, B., MORRISON, V.A., WAPELHORST, B., SPIELMAN, R.S., GOGOLIN-EWENS, K.J., SHEPARD, J.M., WILLIAMS, S.R., RISCH, N., HINDS, D., IWASAKI, N., OGATA, M., OMORI, Y., PETZOLD, C., RIETZCH, H., SCHRODER, H.E., SCHULZE, J., COX, N.J., MENZEL, S., BORIRAJ, V.V., CHEN, X., LIM, L.R., LINDNER, T., MEREU, L.E., WANG, Y.Q., XIANG, K., YAMAGATA, K., YANG, Y. & BELL, G.I. **(1996)**. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet*, 13, 161-6.

- HANSEN, L.L., IKEDA, Y., OLSEN, G.S., BUSCH, A.K. & MOSTHAF, L. **(1999)**. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Evidence for a role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J Biol Chem*, 274, 25078-84.
- HARDIE, D.G., CARLING, D. & CARLSON, M. **(1998)**. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*, 67, 821-55.
- HAVEL, P.J., PARRY, S.J., STERN, J.S., AKPAN, J.O., GINGERICH, R.L., TABORSKY, G.J., JR. & CURRY, D.L. **(1994)**. Redundant parasympathetic and sympathoadrenal mediation of increased glucagon secretion during insulin-induced hypoglycemia in conscious rats. *Metabolism*, 43, 860-6.
- HAWKINS, M., BARZILAI, N., LIU, R., HU, M., CHEN, W. & ROSSETTI, L. **(1997)**. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 99, 2173-82.
- HAYASHI, T., HIRSHMAN, M.F., KURTH, E.J., WINDER, W.W. & GOODYEAR, L.J. **(1998)**. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes*, 47, 1369-73.
- HENQUIN, J.C. & MEISSNER, H.P. **(1986)**. Cyclic adenosine monophosphate differently affects the response of mouse pancreatic beta-cells to various amino acids. *J Physiol*, 381, 77-93.
- HOGG, N., SINGH, R.J. & KALYANARAMAN, B. **(1996)**. The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett*, 382, 223-8.
- HOGG, N. **(2002)**. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 42, 585-600.
- HONIG, C.R., ODOROFF, C.L. & FRIERSON, J.L. **(1982)**. Active and passive capillary control in red muscle at rest and in exercise. *Am J Physiol*, 243, H196-206.
- HOSKING, D.J., BENNETT, T. & HAMPTON, J.R. **(1978)**. Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, 27, 1043-55.
- HOTAMISLIGIL, G.S. **(1999a)**. The role of TNF $\alpha$  and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med*, 245, 621-5.
- HOTAMISLIGIL, G.S. **(1999b)**. Mechanisms of TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107, 119-25.
- HSIEH, P.S., MOORE, M.C., MARSHALL, B., PAGLIASSOTTI, M.J., SHAY, B., SZURKUS, D., NEAL, D.W. & CHERRINGTON, A.D. **(1999)**. The head arterial glucose level is not the reference site for generation of the portal signal in conscious dogs. *Am J Physiol*, 277, E678-84.
- HUDLICKA, O. & EL KHELLY, F. **(1985)**. Metabolic factors involved in regulation of muscle blood flow. *J Cardiovasc Pharmacol*, 7 Suppl 3, S59-72.
- HUE, L. **(1987)**. Gluconeogenesis and its regulation. *Diabetes Metab Rev*, 3, 111-26.

- HUTBER, C.A., HARDIE, D.G. & WINDER, W.W. **(1997)**. Electrical stimulation inactivates muscle acetyl-CoA carboxylase and increases AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol*, 272, E262-6.
- HWANG, T.L., WU, C.C. & TENG, C.M. **(1998)**. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br J Pharmacol*, 125, 1158-63.
- IGNARRO, L.J., BUSH, P.A., BUGA, G.M. & RAJFER, J. **(1990)**. Neurotransmitter identity doubt. *Nature*, 347, 131-2.
- IGNARRO, L.J. **(1992)**. Mechanism of action of nitric oxide: heme-dependent activation of guanylate cyclase represents a unifying signal transduction mechanism. *Jpn J Pharmacol*, 58 Suppl 2, 207P-212P.
- ISHIDA, T., CHAP, Z., CHOU, J., LEWIS, R., HARTLEY, C., ENTMAN, M. & FIELD, J.B. **(1983)**. Differential effects of oral, peripheral intravenous, and intraportal glucose on hepatic glucose uptake and insulin and glucagon extraction in conscious dogs. *J Clin Invest*, 72, 590-601.
- JIA, L., BONAVENTURA, C., BONAVENTURA, J. & STAMLER, J.S. **(1996)**. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, 380, 221-6.
- JONES, P.M. & PERSAUD, S.J. **(1998)**. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocr Rev*, 19, 429-61.
- KAHN, C.R. **(1994)**. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 43, 1066-84.
- KAHN, C.R., BRUNING, J.C., MICHAEL, M.D. & KULKARNI, R.N. **(2000)**. Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 13 Suppl 6, 1377-84.
- KASHIWAGI, A., HUECKSTEADT, T.P. & FOLEY, J.E. **(1983)**. The regulation of glucose transport by cAMP stimulators via three different mechanisms in rat and human adipocytes. *J Biol Chem*, 258, 13685-92.
- KENNEDY, B.P., RAO, F., BOTIGLIERI, T., SHARMA, S., LILLIE, E.O., ZIEGLER, M.G. & O'CONNOR D, T. **(2005)**. Contributions of the sympathetic nervous system, glutathione, body mass and gender to blood pressure increase with normal aging: influence of heredity. *J Hum Hypertens*, 19, 951-69.
- KHAMAI, M., KAVEL, O., ROSENSTOCK, M., PORAT, M., YULI, M., KAISER, N. & RUDICH, A. **(2000)**. Effect of inhibition of glutathione synthesis on insulin action: in vivo and in vitro studies using buthionine sulfoximine. *Biochem J*, 349, 579-86.
- KOBAYASHI, K. **(2005)**. Adipokines: therapeutic targets for metabolic syndrome. *Curr Drug Targets*, 6, 525-9.

- KOBZIK, L., REID, M.B., BREDT, D.S. & STAMLER, J.S. **(1994)**. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, 372, 546-8.
- KOBZIK, L., STRINGER, B., BALLIGAND, J.L., REID, M.B. & STAMLER, J.S. **(1995)**. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun*, 211, 375-81.
- KOLA, B., HUBINA, E., TUCCI, S.A., KIRKHAM, T.C., GARCIA, E.A., MITCHELL, S.E., WILLIAMS, L.M., HAWLEY, S.A., HARDIE, D.G., GROSSMAN, A.B. & KORBONITS, M. **(2005)**. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 280, 25196-201.
- KOVACS, P. & STUMVOLL, M. **(2005)**. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19, 625-35.
- KRAMER, D., SHAPIRO, R., ADLER, A., BUSH, E. & RONDINONE, C.M. **(2001)**. Insulin-sensitizing effect of rosiglitazone (BRL-49653) by regulation of glucose transporters in muscle and fat of Zucker rats. *Metabolism*, 50, 1294-300.
- KUSNER, L.L. & KAMINSKI, H.J. **(1996)**. Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Res*, 730, 238-42.
- KVIETYS, P.R. & GRANGER, D.N. **(1982)**. Vasoactive agents and splanchnic oxygen uptake. *Am J Physiol*, 243, G1-9.
- LAGER, I., ATTVALL, S., ERIKSSON, B.M., VON SCHENK, H. & SMITH, U. **(1986)**. Studies on the insulin-antagonistic effect of catecholamines in normal man. Evidence for the importance of beta 2-receptors. *Diabetologia*, 29, 409-16.
- LANG, D.A., MATTHEWS, D.R., PETO, J. & TURNER, R.C. **(1979)**. Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N Engl J Med*, 301, 1023-7.
- LANG, D.A., MATTHEWS, D.R., BURNETT, M. & TURNER, R.C. **(1981)**. Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes*, 30, 435-9.
- LANG, D.A., MATTHEWS, D.R., BURNETT, M., WARD, G.M. & TURNER, R.C. **(1982)**. Pulsatile, synchronous basal insulin and glucagon secretion in man. *Diabetes*, 31, 22-6.
- LATOUR, M.G. & LAUTT, W.W. **(2002)**. Insulin sensitivity regulated by feeding in the conscious unrestrained rat. *Can J Physiol Pharmacol*, 80, 8-12.
- LAURO, D., KIDO, Y., CASTLE, A.L., ZARNOWSKI, M.J., HAYASHI, H., EBINA, Y. & ACCILI, D. **(1998)**. Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue. *Nat Genet*, 20, 294-8.
- LAUTT, W.W. **(1980)**. Hepatic parasympathetic neuropathy as cause of maturity-onset diabetes? *Gen Pharmacol*, 11, 343-5.

- LAUTT, W.W. **(1983)**. Afferent and efferent neural roles in liver function. *Prog Neurobiol*, 21, 323-48.
- LAUTT, W.W., WANG, X., SADRI, P., LEGARE, D.J. & MACEDO, M.P. **(1998a)**. Rapid insulin sensitivity test (RIST). *Can J Physiol Pharmacol*, 76, 1080-6.
- LAUTT, W.W. & XIE, H. **(1998b)**. Intraportal acetylcholine reverses insulin resistance caused by chronic bile duct ligation. *Proc West Pharmacol Soc*, 41, 35-6.
- LAUTT, W.W. **(1999)**. The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, 77, 553-62.
- LAUTT, W.W., MACEDO, M.P., SADRI, P., TAKAYAMA, S., DUARTE RAMOS, F. & LEGARE, D.J. **(2001)**. Hepatic parasympathetic (HISS) control of insulin sensitivity determined by feeding and fasting. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G29-36.
- LAUTT, W.W. **(2003)**. Practice and principles of pharmacodynamic determination of HISS-dependent and HISS-independent insulin action: methods to quantitate mechanisms of insulin resistance. *Med Res Rev*, 23, 1-14.
- LAUTT, W.W. **(2004)**. A new paradigm for diabetes and obesity: the hepatic insulin sensitizing substance (HISS) hypothesis. *J Pharmacol Sci*, 95, 9-17.
- LEE, A.D., HANSEN, P.A., SCHLUTER, J., GULVE, E.A., GAO, J. & HOLLOSZY, J.O. **(1997)**. Effects of epinephrine on insulin-stimulated glucose uptake and GLUT-4 phosphorylation in muscle. *Am J Physiol*, 273, C1082-7.
- LEISER, M. & FLEISCHER, N. **(1996)**. cAMP-dependent phosphorylation of the cardiac-type alpha 1 subunit of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel in a murine pancreatic beta-cell line. *Diabetes*, 45, 1412-8.
- LEITER, L.A., CERIELLO, A., DAVIDSON, J.A., HANEFELD, M., MONNIER, L., OWENS, D.R., TAJIMA, N. & TUOMILEHTO, J. **(2005)**. Postprandial glucose regulation: new data and new implications. *Clin Ther*, 27 Suppl B, S42-56.
- LEONARD, T.O. & LYDIC, R. **(1997)**. Pontine nitric oxide modulates acetylcholine release, rapid eye movement sleep generation, and respiratory rate. *J Neurosci*, 17, 774-85.
- LEONG, K.W., P. **(2001)**. *Diabetes Ilustrada- Um guia ilustrado sobre a diabetes e as suas complicações*. Londres: Current Medical Literature, Lda.
- LEOPOLD, J.A. & LOSCALZO, J. **(1997)**. New developments in nitrovasodilator therapy. *Vasc Med*, 2, 190-202.
- LEOPOLD, J.A. & LOSCALZO, J. **(2000)**. Clinical importance of understanding vascular biology. *Cardiol Rev*, 8, 115-23.
- LEVY, E.J., ANDERSON, M.E. & MEISTER, A. **(1993)**. Transport of glutathione diethyl ester into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9171-5.

- LEYVA, F., GODSLAND, I.F., WORTHINGTON, M., WALTON, C. & STEVENSON, J.C. **(1998)**. Factors of the metabolic syndrome: baseline interrelationships in the first follow-up cohort of the HDDRISC Study (HDDRISC-1). *Heart Disease and Diabetes Risk Indicators in a Screened Cohort. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18, 208-14.
- LIPTON, A.J., JOHNSON, M.A., MACDONALD, T., LIEBERMAN, M.W., GOZAL, D. & GASTON, B. **(2001)**. S-nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature*, 413, 171-4.
- LIPTON, S.A., CHOI, Y.B., PAN, Z.H., LEI, S.Z., CHEN, H.S., SUCHER, N.J., LOSCALZO, J., SINGEL, D.J. & STAMLER, J.S. **(1993)**. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364, 626-32.
- LIPTON, S.A. **(2001)**. Physiology. Nitric oxide and respiration. *Nature*, 413, 118-9, 121.
- LISBOA, P.P.D.C., A; VILAR, D; BERNARDINO, D; LAM, JB; CALDEIRA, JC; GONÇALVES, M; SÁ MARQUES, M; LUÍS, ML; CRISTINA, ML; CASTEL-BRANCO, N; ANDRÉ, O; RAMALHO, P **(1975)**. *Diabetes-Clinica e Terapêutica da Diabetes Mellitus*. Lisboa: Laboratórios Pfizer.
- LIU, L., YAN, Y., ZENG, M., ZHANG, J., HANES, M.A., AHEARN, G., MCMAHON, T.J., DICKFELD, T., MARSHALL, H.E., QUE, L.G. & STAMLER, J.S. **(2004)**. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*, 116, 617-28.
- LOMBARDI, A.M., FABRIS, R., BASSETTO, F., SERRA, R., LETURQUE, A., FEDERSPIEL, G., GIRARD, J. & VETTOR, R. **(1999)**. Hyperlactatemia reduces muscle glucose uptake and GLUT-4 mRNA while increasing (E1 $\alpha$ )PDH gene expression in rat. *Am J Physiol*, 276, E922-9.
- LONG, Y.C. & ZIERATH, J.R. **(2006)**. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest*, 116, 1776-83.
- LONNROTH, P. & SMITH, U. **(1983)**. beta-Adrenergic dependent downregulation of insulin binding in rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 112, 972-9.
- LU, S.C., KUHNENKAMP, J., GARCIA-RUIZ, C. & KAPLOWITZ, N. **(1991)**. Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *J Clin Invest*, 88, 260-9.
- LU, S.C. **(1998)**. Regulation of hepatic glutathione synthesis. *Semin Liver Dis*, 18, 331-43.
- LUND, S., HOLMAN, G.D., SCHMITZ, O. & PEDERSEN, O. **(1995)**. Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5817-21.
- MADDUX, B.A., SEE, W., LAWRENCE, J.C., JR., GOLDFINE, A.L., GOLDFINE, I.D. & EVANS, J.L. **(2001)**. Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes*, 50, 404-10.
- MANNICK, J.B. & SCHONHOFF, C.M. **(2002)**. Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch Biochem Biophys*, 408, 1-6.

- MARINHO, H.S., BAPTISTA, M. & PINTO, R.E. **(1997)**. Glutathione metabolism in hepatoma liver of rats treated with diethylnitrosamine. *Biochim Biophys Acta*, 1360, 157-68.
- MARTINA, V., BRUNO, G.A., ZUMPANO, E., ORIGLIA, C., QUARANTA, L. & PESCARMONA, G.P. **(2001)**. Administration of glutathione in patients with type 2 diabetes mellitus increases the platelet constitutive nitric oxide synthase activity and reduces PAI-1. *J Endocrinol Invest*, 24, 37-41.
- MATSUJIMA, M., YAMASAKI, Y., SHIBA, Y., NAKAHARA, I., KURODA, A., TOMITA, T., IIDA, M., IKEDA, M., KAJIMOTO, Y., KUBOTA, M. & HORI, M. **(2000)**. Important role of the hepatic vagus nerve in glucose uptake and production by the liver. *Metabolism*, 49, 11-6.
- MAYER, B., BRUNNER, F. & SCHMIDT, K. **(1993)**. Novel actions of methylene blue. *Eur Heart J*, 14 Suppl I, 22-6.
- MAYER, B., SCHRAMMEL, A., KLATT, P., KOESLING, D. & SCHMIDT, K. **(1995)**. Peroxynitrite-induced accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase. Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation. *J Biol Chem*, 270, 17355-60.
- MAYER, B., PFEIFFER, S., SCHRAMMEL, A., KOESLING, D., SCHMIDT, K. & BRUNNER, F. **(1998)**. A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione. *J Biol Chem*, 273, 3264-70.
- MCGOWDER, D., RAGOOBIRSINGH, D. & DASGUPTA, T. **(1999)**. The hyperglycemic effect of S-nitrosoglutathione in the dog. *Nitric Oxide*, 3, 481-91.
- MCGROWDER, D., RAGOOBIRSINGH, D. & DASGUPTA, T. **(2001)**. Effects of S-Nitroso-N-acetylpenicillamine Administration on Glucose Tolerance and Plasma Levels of Insulin and Glucagon in the Dog. *Nitric Oxide*, 5, 402-412.
- MCGROWDER, D., RAGOOBIRSINGH, D. & DASGUPTA, T. **(2002)**. Decreased insulin binding to mononuclear leucocytes and erythrocytes from dogs after S-nitroso-N-acetylpenicillamine administration. *BMC Biochem*, 3, 1.
- MCGROWDER, D., RAGOOBIRSINGH, D. & BROWN, P. **(2006a)**. Modulation of glucose uptake in adipose tissue by nitric oxide-generating compounds. *J Biosci*, 31, 347-54.
- MCGROWDER, D., RAGOOBIRSINGH, D. & BROWN, P. **(2006b)**. Acute effects of exogenous nitric oxide on glucose uptake in skeletal muscle of normoglycaemic and diabetic rats. *Med Sci Monit*, 12, BR28-35.
- MCLAUGHLIN, T. & REAVEN, G. **(2000)**. Insulin resistance and hypertension. Patients in double jeopardy for cardiovascular disease. *Geriatrics*, 55, 28-32, 35.
- MCLENNAN, S.V., HEFFERNAN, S., WRIGHT, L., RAE, C., FISHER, E., YUE, D.K. & TURTLE, J.R. **(1991)**. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes*, 40, 344-8.



- MEIER, J.J. & NAUCK, M.A. **(2006)**. Incretins and the development of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*, 6, 194-201.
- MEISTER, A. **(1995)**. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol*, 251, 3-7.
- MELLION, B.T., IGNARRO, L.J., OHLSTEIN, E.H., PONTECORVO, E.G., HYMAN, A.L. & KADOWITZ, P.J. **(1981)**. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood*, 57, 946-55.
- MELLION, B.T., IGNARRO, L.J., MYERS, C.B., OHLSTEIN, E.H., BALLOT, B.A., HYMAN, A.L. & KADOWITZ, P.J. **(1983)**. Inhibition of human platelet aggregation by S-nitrosothiols. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase and stimulation of cyclic GMP accumulation. *Mol Pharmacol*, 23, 653-64.
- MERRILL, G.F., KURTH, E.J., HARDIE, D.G. & WINDER, W.W. **(1997)**. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol*, 273, E1107-12.
- MICHAEL, M.D., KULKARNI, R.N., POSTIC, C., PREVIS, S.F., SHULMAN, G.I., MAGNUSON, M.A. & KAHN, C.R. **(2000)**. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell*, 6, 87-97.
- MING, Z., HAN, C. & LAUTT, W.W. **(2000)**. Nitric oxide inhibits norepinephrine-induced hepatic vascular responses but potentiates hepatic glucose output. *Can J Physiol Pharmacol*, 78, 36-44.
- MINOKOSHI, Y., ALQUIER, T., FURUKAWA, N., KIM, Y.B., LEE, A., XUE, B., MU, J., FOUFELLE, F., FERRE, P., BIRNBAUM, M.J., STUCK, B.J. & KAHN, B.B. **(2004)**. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, 428, 569-74.
- MODIG, H. **(1968)**. Cellular mixed disulphides between thiols and proteins, and their possible implication for radiation protection. *Biochem Pharmacol*, 17, 177-86.
- MONDON, C.E. & BURTON, S.D. **(1971)**. Factors modifying carbohydrate metabolism and effect of insulin in perfused rat liver. *Am J Physiol*, 220, 724-34.
- MONZILLO, L.U. & HAMDY, O. **(2003)**. Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutr Rev*, 61, 397-412.
- MOORE, M.C., PAGLIASSOTTI, M.J., GOLDSTEIN, R.E., ASHER, J., MURRELL, J., NEAL, D. & CHERRINGTON, A.D. **(1994)**. The effect of the hepatic nerves on the disposition of a mixed meal by conscious dogs. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 18, 248-55.
- MOORE, M.C., SATAKE, S., BARANOWSKI, B., HSIEH, P.S., NEAL, D.W. & CHERRINGTON, A.D. **(2002)**. Effect of hepatic denervation on peripheral insulin sensitivity in conscious dogs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, E286-96.

- MORA, S. & PESSIN, J.E. **(2002)**. An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Res Rev*, 18, 345-56.
- MORLEY, J.E. & MATTAMMAL, M.B. **(1996)**. Nitric oxide synthase levels in obese Zucker rats. *Neurosci Lett*, 209, 137-9.
- MUSI, N., YU, H. & GOODYEAR, L.J. **(2003)**. AMP-activated protein kinase regulation and action in skeletal muscle during exercise. *Biochem Soc Trans*, 31, 191-5.
- NATALI, A., QUINONES GALVAN, A., PECORI, N., SANNA, G., TOSCHI, E. & FERRANNINI, E. **(1998)**. Vasodilation with sodium nitroprusside does not improve insulin action in essential hypertension. *Hypertension*, 31, 632-6.
- NEEL, J.V. **(1962)**. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet*, 14, 353-62.
- NICOLAIDIS, S. **(1981)**. Lateral hypothalamic control of metabolic factors related to feeding. *Diabetologia*, 20 Suppl, 426-34.
- NIELSEN, J.N., JORGENSEN, S.B., FROSIG, C., VIOLLET, B., ANDREELLI, F., VAULONT, S., KIENS, B., RICHTER, E.A. & WOJTASZEWSKI, J.F. **(2003)**. A possible role for AMP-activated protein kinase in exercise-induced glucose utilization: insights from humans and transgenic animals. *Biochem Soc Trans*, 31, 186-90.
- NIIJIMA, A. **(1969)**. Afferent impulse discharges from glucoreceptors in the liver of the guinea pig. *Ann N Y Acad Sci*, 157, 690-700.
- NIIJIMA, A. **(1981)**. Visceral afferents and metabolic function. *Diabetologia*, 20 Suppl, 325-30.
- NIIJIMA, A. **(1986)**. Neural control of blood glucose level. *Jpn J Physiol*, 36, 827-41.
- NILSSON, T., ARKHAMMAR, P., RORSMAN, P. & BERGGREN, P.O. **(1989)**. Suppression of insulin release by galanin and somatostatin is mediated by a G-protein. An effect involving repolarization and reduction in cytoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration. *J Biol Chem*, 264, 973-80.
- OBICI, S., ZHANG, B.B., KARKANIAS, G. & ROSSETTI, L. **(2002)**. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*, 8, 1376-82.
- OGIHARA, T., ASANO, T., KATAGIRI, H., SAKODA, H., ANAI, M., SHOJIMA, N., ONO, H., FUJISHIRO, M., KUSHIYAMA, A., FUKUSHIMA, Y., KIKUCHI, M., NOGUCHI, N., ABURATANI, H., GOTOH, Y., KOMURO, I. & FUJITA, T. **(2004)**. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia*, 47, 794-805.
- OLSEN, M.H., ANDERSEN, U.B., WACHTELL, K., IBSEN, H. & DIGE-PETERSEN, H. **(2000)**. A possible link between endothelial dysfunction and insulin resistance in hypertension. A LIFE substudy. Losartan Intervention For Endpoint-Reduction in Hypertension. *Blood Press*, 9, 132-9.

- OOKHTENS, M. & KAPLOWITZ, N. **(1998)**. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis*, 18, 313-29.
- OOMURA, Y. & YOSHIMATSU, H. **(1984)**. Neural network of glucose monitoring system. *J Auton Nerv Syst*, 10, 359-72.
- OPARA, E.C. **(2004)**. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J Investig Med*, 52, 19-23.
- O'RAHILLY, S., KROOK, A., MORGAN, R., REES, A., FLIER, J.S. & MOLLER, D.E. **(1992)**. Insulin receptor and insulin-responsive glucose transporter (GLUT 4) mutations and polymorphisms in a Welsh type 2 (non-insulin-dependent) diabetic population. *Diabetologia*, 35, 486-9.
- OROSCO, M. & GEROZISSIS, K. **(2001)**. Macronutrient-induced cascade of events leading to parallel changes in hypothalamic serotonin and insulin. *Neurosci Biobehav Rev*, 25, 167-74.
- OSSWALD, W.G., S. **(2000)**. *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas.*: Porto Editora.
- OWEN, O.E., FELIG, P., MORGAN, A.P., WAHREN, J. & CAHILL, G.F., JR. **(1969)**. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest*, 48, 574-83.
- PAGLIASSOTTI, M.J., MOORE, M.C., NEAL, D.W. & CHERRINGTON, A.D. **(1992)**. Insulin is required for the liver to respond to intraportal glucose delivery in the conscious dog. *Diabetes*, 41, 1247-56.
- PAGLIASSOTTI, M.J., HOLSTE, L.C., MOORE, M.C., NEAL, D.W. & CHERRINGTON, A.D. **(1996)**. Comparison of the time courses of insulin and the portal signal on hepatic glucose and glycogen metabolism in the conscious dog. *J Clin Invest*, 97, 81-91.
- PALMER, R.M., ASHTON, D.S. & MONCADA, S. **(1988)**. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333, 664-6.
- PAOLISSO, G., SGAMBATO, S., GENTILE, S., MEMOLI, P., GIUGLIANO, D., VARRICCHIO, M. & D'ONOFRIO, F. **(1988)**. Advantageous metabolic effects of pulsatile insulin delivery in noninsulin-dependent diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 67, 1005-10.
- PAOLISSO, G., DI MARO, G., PIZZA, G., D'AMORE, A., SGAMBATO, S., TESAURO, P., VARRICCHIO, M. & D'ONOFRIO, F. **(1992a)**. Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol*, 263, E435-40.
- PAOLISSO, G., GIUGLIANO, D., PIZZA, G., GAMBARDELLA, A., TESAURO, P., VARRICCHIO, M. & D'ONOFRIO, F. **(1992b)**. Glutathione infusion potentiates glucose-induced insulin secretion in aged patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*, 15, 1-7.
- PENICAUD, L., FERRE, P., KANDE, J., LETURQUE, A., ISSAD, T. & GIRARD, J. **(1987)**. Effect of anesthesia on glucose production and utilization in rats. *Am J Physiol*, 252, E365-9.

- PERSAUD, S.J. & JONES, P.M. **(1993)**. The involvement of protein kinase C in glucose-stimulated insulin secretion. *Biochem Soc Trans*, 21, 428S.
- PETERSEN, K.F. & TYGSTRUP, N. **(1994)**. A liver factor increasing glucose uptake in rat hindquarters. *J Hepatol*, 20, 461-5.
- PETERSON, H.R., ROTHCHILD, M., WEINBERG, C.R., FELL, R.D., MCLEISH, K.R. & PFEIFER, M.A. **(1988)**. Body fat and the activity of the autonomic nervous system. *N Engl J Med*, 318, 1077-83.
- PETERSON, K.A. & SMITH, C.K. **(1995)**. The DCCT findings and standards of care for diabetes. *Am Fam Physician*, 52, 1092-8.
- PICKUP, J.C.W., GARETH **(2003)**. *Textbook of Diabetes*. Oxford: Blackwell Publishers.
- PITKANEN, O.P., LAINE, H., KEMPPAINEN, J., ERONEN, E., ALANEN, A., RAITAKARI, M., KIRVELA, O., RUOTSALAINEN, U., KNUUTI, J., KOIVISTO, V.A. & NUUTILA, P. **(1999)**. Sodium nitroprusside increases human skeletal muscle blood flow, but does not change flow distribution or glucose uptake. *J Physiol*, 521 Pt 3, 729-37.
- PLAS, C., FOREST, N., PRINGAULT, E. & MENUELLE, P. **(1982)**. Contribution of glucose and gluconeogenic substrates to insulin-stimulated glycogen synthesis in cultured fetal hepatocytes. *J Cell Physiol*, 113, 475-80.
- PLUM, L., SCHUBERT, M. & BRUNING, J.C. **(2005)**. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 59-65.
- POCAI, A., LAM, T.K., GUTIERREZ-JUAREZ, R., OBICI, S., SCHWARTZ, G.J., BRYAN, J., AGUILAR-BRYAN, L. & ROSSETTI, L. **(2005)**. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature*, 434, 1026-31.
- PONTIROLI, A.E., CAPRA, F., VEGLIA, F., FERRARI, M., XIANG, K.S., BELL, G.I., BARONI, M.G., GALTON, D.J., WEAVER, J.U., HITMAN, G.A., KOPELMAN, P.G., MOHAN, V. & VISWANATHAN, M. **(1996)**. Genetic contribution of polymorphism of the GLUT1 and GLUT4 genes to the susceptibility to type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in different populations. *Acta Diabetol*, 33, 193-7.
- PORKSEN, N., MUNN, S., STEERS, J., VELDHIJS, J.D. & BUTLER, P.C. **(1995)**. Impact of sampling technique on appraisal of pulsatile insulin secretion by deconvolution and cluster analysis. *Am J Physiol*, 269, E1106-14.
- PORSZASZ, R., LEGVARI, G., NEMETH, J., LITERATI, P.N., SZOLCSANYI, J. & SZILVASSY, Z. **(2002)**. The sensory nitrenergic nature of the hepatic insulin sensitizing substance mechanism in conscious rabbits. *Eur J Pharmacol*, 443, 211-2.
- PORSZASZ, R., LEGVARI, G., PATAKI, T., SZILVASSY, J., NEMETH, J., KOVACS, P., PARAGH, G., SZOLCSANYI, J. & SZILVASSY, Z. **(2003)**. Hepatic insulin sensitizing substance: a novel 'sensocrine'

- mechanism to increase insulin sensitivity in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol*, 139, 1171-9.
- PORTER, J.P., JOSHUA, I.G., KABITHE, D. & BOKIL, H.S. **(1997)**. Vasodilator effect of insulin on the microcirculation of the rat cremaster muscle. *Life Sci*, 61, 673-84.
- PUTKEY, J.A., DRAETTA, G.F., SLAUGHTER, G.R., KLEE, C.B., COHEN, P., STULL, J.T. & MEANS, A.R. **(1986)**. Genetically engineered calmodulins differentially activate target enzymes. *J Biol Chem*, 261, 9896-903.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M. & MONCADA, S. **(1987)**. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2, 1057-8.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M. & MONCADA, S. **(1991)**. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol Sci*, 12, 87-8.
- RADZIUK, J. **(1991)**. The liver and glycogen metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 15, 77S-81S.
- RADZIUK, J. **(2000)**. Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 4426-33.
- RAGOOBIRSINGH, D., MCGROWDER, D., DASGUPTA, T. & BROWN, P. **(2004)**. The effect of nitric oxide on glucose metabolism. *Mol Cell Biochem*, 263, 29-34.
- RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., HALES, C.N. & NEWSHOLME, E.A. **(1963)**. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1, 785-9.
- REES, D.D., PALMER, R.M., SCHULZ, R., HODSON, H.F. & MONCADA, S. **(1990)**. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 101, 746-52.
- REID, M.A., LATOUR, M.G., LEGARE, D.J., RONG, N. & LAUTT, W.W. **(2002)**. Comparison of the rapid insulin sensitivity test (RIST), the insulin tolerance test (ITT), and the hyperinsulinemic euglycemic clamp (HIEC) to measure insulin action in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 80, 811-8.
- REID, M.A. & LAUTT, W.W. **(2004)**. Pattern of insulin delivery affects hepatic insulin sensitizing substance (HISS) action and insulin resistance. *Can J Physiol Pharmacol*, 82, 1068-1074.
- RIBEIRO, R.T., DUARTE-RAMOS, F. & MACEDO, M.P. **(2001a)**. The fatty Zucker rat fa/fa shows a dysfunction of the HISS-dependent and -independent components of insulin action. *Proc West Pharmacol Soc*, 44, 29-30.
- RIBEIRO, R.T., DUARTE-RAMOS, F. & MACEDO, M.P. **(2001b)**. Effect of the hepatic insulin sensitizing substance in the spontaneously hypertensive rat. *Proc West Pharmacol Soc*, 44, 27-8.

- RIBEIRO, R.T., LAUTT, W.W., LEGARE, D.J. & MACEDO, M.P. **(2005)**. Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia*, 48, 976-83.
- RIBEIRO, R.T., AFONSO, R.A. & MACEDO, M.P. **(2007)**. Hepatic parasympathetic role in insulin resistance on an animal model of hypertension. *Metabolism*, 56, 227-33.
- RIZZO, M.A. & PISTON, D.W. **(2003)**. Regulation of beta cell glucokinase by S-nitrosylation and association with nitric oxide synthase. *J Cell Biol*, 161, 243-8.
- ROBERTS, C.K., BARNARD, R.J., SCHECK, S.H. & BALON, T.W. **(1997)**. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am J Physiol*, 273, E220-5.
- ROBERTS, C.K., BARNARD, R.J., JASMAN, A. & BALON, T.W. **(1999)**. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 277, E390-4.
- ROBERTSON, M.D., MASON, A.O. & FRAYN, K.N. **(2002)**. Timing of vagal stimulation affects postprandial lipid metabolism in humans. *Am J Clin Nutr*, 76, 71-7.
- ROGERS, S., MACHEDA, M.L., DOCHERTY, S.E., CARTY, M.D., HENDERSON, M.A., SOELLER, W.C., GIBBS, E.M., JAMES, D.E. & BEST, J.D. **(2002)**. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282, E733-8.
- RORSMAN, P. & RENSTROM, E. **(2003)**. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 46, 1029-45.
- ROTTER, V., NAGAEV, I. & SMITH, U. **(2003)**. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*, 278, 45777-84.
- RUDICH, A., TIROSH, A., POTASHNIK, R., KHAMIASI, M. & BASHAN, N. **(1999)**. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*, 42, 949-57.
- SADRI, P., LEGARE, D.J. & LAUTT, W.W. **(1997)**. Insulin resistance caused by nitric oxide synthase inhibition. *Proc West Pharmacol Soc*, 40, 19-20.
- SADRI, P. & LAUTT, W.W. **(1998)**. Blockade of nitric oxide production in the liver causes insulin resistance. *Proc West Pharmacol Soc*, 41, 37-8.
- SADRI, P. & LAUTT, W.W. **(1999)**. Blockade of hepatic nitric oxide synthase causes insulin resistance. *Am J Physiol*, 277, G101-8.
- SADRI, P., LEGARE, D.J., TAKAYAMA, S. & LAUTT, W.W. **(2005)**. Increased incidence of hepatic insulin-sensitizing substance (HISS)-dependent insulin resistance in female rats prenatally exposed to ethanol. *Can J Physiol Pharmacol*, 83, 383-7.
- SAKAGUCHI, T. & YAMAZAKI, M. **(1988)**. Hepatic portal injection of glucose elevates efferent sympathetic discharges of interscapular brown adipose tissue. *Exp Neurol*, 101, 464-9.

- SALTIEL, A.R. & KAHN, C.R. **(2001)**. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414, 799-806.
- SCHERRER, U., RANDIN, D., VOLLENWEIDER, P., VOLLENWEIDER, L. & NICOD, P. **(1994)**. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest*, 94, 2511-5.
- SCHERRER, U. & SARTORI, C. **(2000)**. Defective nitric oxide synthesis: a link between metabolic insulin resistance, sympathetic overactivity and cardiovascular morbidity. *Eur J Endocrinol*, 142, 315-23.
- SCHMITZ, O., BROCK, B., HOLLINGDAL, M., JUHL, C.B. & PORKSEN, N. **(2002)**. High-frequency insulin pulsatility and type 2 diabetes: from physiology and pathophysiology to clinical pharmacology. *Diabetes Metab*, 28, 4S14-20.
- SCHRAMMEL, A., PFEIFFER, S., SCHMIDT, K., KOESLING, D. & MAYER, B. **(1998)**. Activation of soluble guanylyl cyclase by the nitrovasodilator 3-morpholiniosydnonimine involves formation of S-nitrosoglutathione. *Mol Pharmacol*, 54, 207-12.
- SCHULZ, V. **(1984)**. Clinical pharmacokinetics of nitroprusside, cyanide, thiosulphate and thiocyanate. *Clin Pharmacokinet*, 9, 239-51.
- SCHWARTZ, M.W., FIGLEWICZ, D.P., BASKIN, D.G., WOODS, S.C. & PORTE, D., JR. **(1992)**. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev*, 13, 387-414.
- SCHWARTZ, M.W. & PORTE, D., JR. **(2005)**. Diabetes, obesity, and the brain. *Science*, 307, 375-9.
- SEHBA, F.A., DING, W.H., CHERESHNEV, I. & BEDERSON, J.B. **(1999)**. Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 30, 1955-61.
- SHARP, G.W. **(1996)**. Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol*, 271, C1781-99.
- SHEARER, J., FUEGER, P.T., VORNDICK, B., BRACY, D.P., ROTTMAN, J.N., CLANTON, J.A. & WASSERMAN, D.H. **(2004)**. AMP kinase-induced skeletal muscle glucose but not long-chain fatty acid uptake is dependent on nitric oxide. *Diabetes*, 53, 1429-35.
- SHEPHERD, P.R., WITHERS, D.J. & SIDDLE, K. **(1998)**. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J*, 333 ( Pt 3), 471-90.
- SHEPHERD, P.R. & KAHN, B.B. **(1999)**. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 341, 248-57.
- SHIMAZU, T. & FUKUDA, A. **(1965)**. Increased activities of glycogenolytic enzymes in liver after splanchnic-nerve stimulation. *Science*, 150, 1607-8.
- SHIMAZU, T. & AMAKAWA, A. **(1968a)**. Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. 3. Differential effects of sympathetic-nerve stimulation and of catecholamines on liver phosphorylase. *Biochim Biophys Acta*, 165, 349-56.

- SHIMAZU, T. & AMAKAWA, A. **(1968b)**. Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. II. Neural control of glycogenolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 165, 335-48.
- SMITH, T.K. & MCCARRON, S.L. **(1998)**. Nitric oxide modulates cholinergic reflex pathways to the longitudinal and circular muscle in the isolated guinea-pig distal colon. *J Physiol*, 512 ( Pt 3), 893-906.
- SMITH, U., KURODA, M. & SIMPSON, I.A. **(1984)**. Counter-regulation of insulin-stimulated glucose transport by catecholamines in the isolated rat adipose cell. *J Biol Chem*, 259, 8758-63.
- SOBEY, C.G. & FARACI, F.M. **(1997)**. Effects of a novel inhibitor of guanylyl cyclase on dilator responses of mouse cerebral arterioles. *Stroke*, 28, 837-42; discussion 842-3.
- SOLTYS, K., DIKDAN, G. & KONERU, B. **(2001)**. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology*, 34, 13-8.
- STAELS, B. & FRUCHART, J.C. **(2005)**. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*, 54, 2460-70.
- STALMANS, W., DE WULF, H., HUE, L. & HERS, H.G. **(1974)**. The sequential inactivation of glycogen phosphorylase and activation of glycogen synthetase in liver after the administration of glucose to mice and rats. The mechanism of the hepatic threshold to glucose. *Eur J Biochem*, 41, 117-34.
- STAMLER, J.S., SINGEL, D.J. & LOSCALZO, J. **(1992)**. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258, 1898-902.
- STAMLER, J.S., LAMAS, S. & FANG, F.C. **(2001)**. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell*, 106, 675-83.
- STAMLER, J.S. **(2003)**. Hemoglobin and nitric oxide. *N Engl J Med*, 349, 402-5; author reply 402-5.
- STAMLER, J.S. **(2004)**. S-nitrosothiols in the blood: roles, amounts, and methods of analysis. *Circ Res*, 94, 414-7.
- STEINBERG, H.O., PARADISI, G., HOOK, G., CROWDER, K., CRONIN, J. & BARON, A.D. **(2000)**. Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production. *Diabetes*, 49, 1231-8.
- STUMPEL, F., SCHOLTKA, B. & JUNGERMANN, K. **(1998)**. Impaired glucose sensing by intrahepatic, muscarinic nerves for an insulin-stimulated hepatic glucose uptake in streptozotocin-diabetic rats. *FEBS Lett*, 436, 185-8.



- SURMELY, J.F., SCHNEITER, P., HENRY, S., PAQUOT, N., JEQUIER, E. & TAPPY, L. **(1999)**. Effects of glucagon in the control of endogenous glucose production in man. *Nutrition*, 15, 267-73.
- SUTHERLAND, E.W., JR. & WOSILAIT, W.D. **(1955)**. Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature*, 175, 169-70.
- SWEET, I.R., PETERSON, L., KROLL, K., GOODNER, C.J., BERRY, M. & GRAHAM, M.M. **(1996)**. Effect of glucose on uptake of radiolabeled glucose, 2-DG, and 3-O-MG by the perfused rat liver. *Am J Physiol*, 271, E384-96.
- TABORSKY, G.J., JR., HALTER, J.B., BAUM, D., BEST, J.D. & PORTE, D., JR. **(1984)**. Pentobarbital anesthesia suppresses basal and 2-deoxy-D-glucose-stimulated plasma catecholamines. *Am J Physiol*, 247, R905-10.
- TATEISHI, N., HIGASHI, T., NARUSE, A., NAKASHIMA, K. & SHIOZAKI, H. **(1977)**. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *J Nutr*, 107, 51-60.
- TIAN, H., MA, A., LI, C., CHENG, M., BAI, L. & LIU, H. **(2000)**. Correlative factors of insulin resistance in essential hypertension. *Hypertens Res*, 23, 265-70.
- TIROSH, A., RUDICH, A. & BASHAN, N. **(2000)**. Regulation of glucose transporters--implications for insulin resistance states. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 13, 115-33.
- TRAYHURN, P. & WOOD, I.S. **(2004)**. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*, 92, 347-55.
- TRIGGLE, C.R., HOLLENBERG, M., ANDERSON, T.J., DING, H., JIANG, Y., CERONI, L., WIEHLER, W.B., NG, E.S., ELLIS, A., ANDREWS, K., MCGUIRE, J.J. & PANNIRSELVAM, M. **(2003)**. The endothelium in health and disease--a target for therapeutic intervention. *J Smooth Muscle Res*, 39, 249-67.
- VAN DE BORNE, P., HAUSBERG, M., HOFFMAN, R.P., MARK, A.L. & ANDERSON, E.A. **(1999)**. Hyperinsulinemia produces cardiac vagal withdrawal and nonuniform sympathetic activation in normal subjects. *Am J Physiol*, 276, R178-83.
- VAN ZUTPHEN, L.B., V; BEYENEN, AC **(2001)**. *Principles of Laboratory Animal Science*. Amsterdam: Elsevier.
- VAZIRI, N.D., WANG, X.Q., OVEISI, F. & RAD, B. **(2000)**. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension*, 36, 142-6.
- VIJAYALINGAM, S., PARTHIBAN, A., SHANMUGASUNDARAM, K.R. & MOHAN, V. **(1996)**. Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med*, 13, 715-9.
- VIOLLET, B., ANDREELLI, F., JORGENSEN, S.B., PERRIN, C., FLAMEZ, D., MU, J., WOJTASZEWSKI, J.F., SCHUIT, F.C., BIRNBAUM, M., RICHTER, E., BURCELIN, R. & VAULONT, S. **(2003)**. Physiological role of

- AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochem Soc Trans*, 31, 216-9.
- WAHREN, J., FELIG, P., CERASI, E. & LUFT, R. **(1972)**. Hepatic glucose and amino acid metabolism in diabetes. *Isr J Med Sci*, 8, 857-8.
- WALDMAN, S.A. & MURAD, F. **(1987)**. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev*, 39, 163-96.
- WALS, P.A. & KATZ, J. **(1993)**. A concentration gradient of glucose from liver to plasma. *Metabolism*, 42, 1492-6.
- WESTLIND-DANIELSSON, A., MULLER, R.M. & BARTFAI, T. **(1990)**. Atropine treatment induced cholinergic supersensitivity at receptor and second messenger levels in the rat salivary gland. *Acta Physiol Scand*, 138, 431-41.
- WIGGAM, M.I., HUNTER, S.J., ARMSTRONG, V.L., ENNIS, C.N., SHERIDAN, B., ATKINSON, A.B. & BELL, P.M. **(2000)**. Insulin resistance and insulin pulsatility in essential hypertension. *J Hypertens*, 18, 743-8.
- WINK, D.A., NIMS, R.W., DARBYSHIRE, J.F., CHRISTODOULOU, D., HANBAUER, I., COX, G.W., LAVAL, F., LAVAL, J., COOK, J.A., KRISHNA, M.C. & ET AL. **(1994)**. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O<sub>2</sub> reaction. *Chem Res Toxicol*, 7, 519-25.
- WITHERS, D.J., GUTIERREZ, J.S., TOWERY, H., BURKS, D.J., REN, J.M., PREVIS, S., ZHANG, Y., BERNAL, D., PONS, S., SHULMAN, G.I., BONNER-WEIR, S. & WHITE, M.F. **(1998)**. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391, 900-4.
- WOJTASZEWSKI, J.F., JORGENSEN, S.B., HELLSTEN, Y., HARDIE, D.G. & RICHTER, E.A. **(2002)**. Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 51, 284-92.
- WOLLHEIM, C.B. & SHARP, G.W. **(1981)**. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev*, 61, 914-73.
- WOOD, I.S. & TRAYHURN, P. **(2003)**. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*, 89, 3-9.
- WRIGHT, D.C., GEIGER, P.C., HOLLOSZY, J.O. & HAN, D.H. **(2005)**. Contraction- and hypoxia-stimulated glucose transport is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism in slow-twitch rat soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288, E1062-6.
- XIE, H., TSYBENKO, V.A., JOHNSON, M.V. & LAUTT, W.W. **(1993)**. Insulin resistance of glucose response produced by hepatic denervations. *Can J Physiol Pharmacol*, 71, 175-8.

- XIE, H. & LAUTT, W.W. **(1994)**. Insulin resistance produced by hepatic denervation or muscarinic cholinergic blockade. *Proc West Pharmacol Soc*, 37, 39-40.
- XIE, H. & LAUTT, W.W. **(1995a)**. Induction of insulin resistance by cholinergic blockade with atropine in the cat. *J Auton Pharmacol*, 15, 361-9.
- XIE, H. & LAUTT, W.W. **(1995b)**. M1 muscarinic receptor blockade causes insulin resistance in the cat. *Proc West Pharmacol Soc*, 38, 83-4.
- XIE, H. & LAUTT, W.W. **(1996a)**. Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *Am J Physiol*, 271, E587-92.
- XIE, H. & LAUTT, W.W. **(1996b)**. Insulin resistance of skeletal muscle produced by hepatic parasympathetic interruption. *Am J Physiol*, 270, E858-63.
- XIE, H., ZHU, L., ZHANG, Y.L., LEGARE, D.J. & LAUTT, W.W. **(1996c)**. Insulin sensitivity tested with a modified euglycemic technique in cats and rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 35, 77-82.
- XUE, B. & KAHN, B.B. **(2006)**. AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J Physiol*, 574, 73-83.
- YAMAMOTO, H.A. **(1992)**. Nitroprusside intoxication: protection of alpha-ketoglutarate and thiosulphate. *Food Chem Toxicol*, 30, 887-90.
- YASUKAWA, T., TOKUNAGA, E., OTA, H., SUGITA, H., MARTYN, J.A. & KANEKI, M. **(2005)**. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem*, 280, 7511-8.
- YOUNG, L.H., RENFU, Y., RUSSELL, R., HU, X., CAPLAN, M., REN, J., SHULMAN, G.I. & SINUSAS, A.J. **(1997a)**. Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation*, 95, 415-22.
- YOUNG, M.E., RADDA, G.K. & LEIGHTON, B. **(1997b)**. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J*, 322 ( Pt 1), 223-8.
- YOUNG, M.E. & LEIGHTON, B. **(1998)**. Evidence for altered sensitivity of the nitric oxide/cGMP signalling cascade in insulin-resistant skeletal muscle. *Biochem J*, 329 ( Pt 1), 73-9.
- YSI **(2001)**. *Glucose Analyser Operations Manual*, YSI Inc.
- YUASA, H., MATSUDA, K. & WATANABE, J. **(1993)**. Influence of anesthetic regimens on intestinal absorption in rats. *Pharm Res*, 10, 884-8.
- YUSUF, S., DAGENAIS, G., POGUE, J., BOSCH, J. & SLEIGHT, P. **(2000)**. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, 342, 154-60.

- ZARKOVIC, M., CIRIC, J., STOJANOVIC, M., PENEZIC, Z., TRBOJEVIC, B., DRESGIC, M. & NESOVIC, M. **(1999)**. Effect of insulin sensitivity on pulsatile insulin secretion. *Eur J Endocrinol*, 141, 494-501.
- ZHANG, Y. & HOGG, N. **(2005)**. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radic Biol Med*, 38, 831-8.
- ZHAO, W.Q. & ALKON, D.L. **(2001)**. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol Cell Endocrinol*, 177, 125-34.
- ZOU, M.H., HOU, X.Y., SHI, C.M., KIRKPATICK, S., LIU, F., GOLDMAN, M.H. & COHEN, R.A. **(2003)**. Activation of 5'-AMP-activated kinase is mediated through c-Src and phosphoinositide 3-kinase activity during hypoxia-reoxygenation of bovine aortic endothelial cells. Role of peroxynitrite. *J Biol Chem*, 278, 34003-10.